

Herstellung eines funktionalen  
Mundschleimhaut-Äquivalents zur personalisierten  
Gewebe-Rekonstruktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Katharina Astrid Peters  
geboren am 21.01.1994 in Wiesbaden

Mainz, 2022

Durchgeführt im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für  
Geburtshilfe und Frauengesundheit an der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Schleimhaut-Transplantate in der rekonstruktiven Chirurgie .....	5
1.2 Die native Mundschleimhaut.....	6
1.3 Gefäßbildung und gefäßbildende Zellen .....	8
1.4 Die <i>in vitro</i> -Herstellung von Geweben aus autologen Zellen .....	11
1.5 Die Prävaskularisierung von <i>in vitro</i> -Geweben .....	14
1.6 Epithelgewebe-Herstellung im <i>Tissue Engineering</i> .....	17
1.7 Das <i>in vitro</i> -prävascularisierte Mundschleimhaut-Äquivalent.....	19
1.8 Zielsetzung .....	22
<b>2. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Material .....	24
2.1.1 Chemikalien .....	24
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	26
2.1.3 Zusätze der Zellkulturmedien.....	26
2.1.4 Zellkulturmedien .....	27
2.1.5 ELISA-Kits .....	28
2.1.6 Microbeads .....	28
2.1.7 Antikörper .....	28
2.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.9 Gebrauchsmaterialien.....	31
2.1.10 Geräte.....	31
2.1.11 Software.....	33
2.1.12 Primärzellen & Isolationsgewebe.....	33
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Steriles Arbeiten .....	33
2.2.2. Gelatine-Beschichtung von Verbrauchsmaterialien .....	34
2.2.3 Primärzell-Isolation .....	34
2.2.3.1 Isolation von Fibroblasten und Epithelzellen aus humaner Mundschleimhaut .....	34
2.2.3.2 Isolation von Endothelzellen aus der juvenilen Vorhaut.....	36
2.2.3.3 Isolation von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Vollblut .....	37
2.2.4 Zellkultur .....	38

2.2.4.1 Kultivierung der Primärzellen .....	38
2.2.4.2 Kryokonservierung und Re-Kultivierung der Primärzellen.....	39
2.2.5 Zellbesiedlung der Kollagenmatrix .....	40
2.2.6 Generierung und Analyse von Zellkulturüberständen .....	42
2.2.7 Zellviabilitätsassays .....	43
2.2.7.1 MTT-Assay .....	43
2.2.7.2 AlamarBlue™-Assay.....	44
2.2.8 Migrationsassay in der Boyden-Kammer .....	44
2.2.9 Chemotaxis-Versuch mit Kollagenmatrix im Transwell-System .....	45
2.2.10 Chemotaxis-Versuch mit Kollagenmatrix mithilfe eines Kollagen I-Gels.....	47
2.2.11 Analyse der Freisetzungskinetik der Nanopartikel .....	49
2.2.12 Zelinjektion in die Kollagenmatrix.....	50
2.2.13 ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent.....	50
2.2.14 CD31-Fluoreszenzfärbung des Mundschleimhaut-Äquivalents .....	51
2.2.15 Charakterisierung der isolierten Zellen aus dem Vollblut .....	52
2.2.16 Chorioallantoismembran-Assay .....	52
2.2.17 Immunhistochemische Färbung des Mundschleimhaut-Äquivalents..	53
2.2.18 Statistische Auswertung.....	55
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
3.1 Primärzell-Isolation aus Patientinnen- und Patientenmaterial.....	56
3.1.1 Fibroblasten-Isolation aus der Mundschleimhaut.....	56
3.1.2 Epithelzell-Isolation aus der Mundschleimhaut .....	57
3.1.3 Endothelzell-Isolation.....	58
3.1.3.1 HDMEC-Isolation aus der juvenilen Vorhaut.....	58
3.1.3.2 ECFC-Isolation aus Vollblut .....	58
3.1.3.2.1 Charakterisierung der ECFC.....	59
3.2 Analyse des Mundschleimhaut-Äquivalents <i>in vitro</i> .....	60
3.2.1 Hydrierung der Kollagenmatrix .....	60
3.2.2 Struktureller Aufbau des Mundschleimhaut-Äquivalents.....	61
3.2.2.1 Ausbildung von Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent .	62
3.2.2.2 Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent .....	64
3.2.2.3 Epithelausbildung des Mundschleimhaut-Äquivalents .....	65
3.2.2.4 Basalmembranausbildung im Mundschleimhaut-Äquivalent.....	67
3.2.3 Parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents .....	68

3.3 Optimierung der Prävasikularisation mittels chemotaktischer Verfahren ...	80
3.3.1 Analyse von VEGF-121 als Chemotaxin für Endothelzellen .....	80
3.3.2 Migration von HDMEC durch Chemokin-Sekretion von Fibroblasten ..	81
3.3.3. Migration von HDMEC durch definierte VEGF-121-Konzentration .....	82
3.3.4 Migration von HDMEC durch VEGF-121-versetztes Gel .....	83
3.3.5 VEGF-121-beladenen Nanopartikel als chemotaktische Quelle .....	85
3.3.5.1 Freisetzungskinetik der Nanopartikel .....	86
3.3.5.2 Zellviabilität unter Nanopartikel-Behandlung.....	90
3.3.5.3 Zellviabilität unter $\alpha$ -Amylase-Behandlung.....	95
3.3.5.4 VEGF-121-Freisetzung aus Nanopartikeln .....	98
3.4 Optimierung der Prävasikularisation mittels mechanischer Verfahren.....	99
3.4.1 Injizieren der Endothelzellen in das Mundschleimhaut-Äquivalent .....	99
3.5 Anregung der Gefäß- sowie Epithelausbildung der Mundschleimhaut-Äquivalente mittels ESWT-Anwendung.....	102
3.5.1 Zellviabilität nach ESWT-Anwendung.....	102
3.5.2 Gefäßausbildung nach ESWT-Anwendung .....	103
3.5.3. Endothelzelllokalisierung nach ESWT-Anwendung .....	105
3.5.4 Fibroblasten und die extrazelluläre Matrix nach ESWT-Anwendung .	107
3.5.5 Ausbildung des Epithels nach ESWT-Anwendung .....	108
3.5.6 Ausbildung der Basalmembran nach ESWT-Anwendung.....	112
3.6 Einwachsen des Mundschleimhaut-Äquivalents <i>in vivo</i> .....	115
3.6.1 Endothelzellen und Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent <i>in vivo</i> .....	115
3.6.2 Versorgung des Epithels des Mundschleimhaut-Äquivalents <i>in vivo</i> .....	120
3.6.3 Versorgung der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents <i>in vivo</i> .....	128
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>133</b>
4.1 Charakterisierung der ECFC aus Vollblut .....	133
4.2 Gefäßbildung innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents während der <i>in vitro</i> -Herstellung.....	134
4.3 Verhalten der Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent während der <i>in vitro</i> -Herstellung .....	136
4.4 Ausbildung des mehrschichtigen Epithels und der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents während der <i>in vitro</i> -Herstellung .....	138
4.5 Parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents .....	140

4.6 Optimierung der Prävasikularisierung mittels chemotaktischer Reize .....	148
4.7 Optimierung der Prävasikularisierung mittels Nanopartikel .....	151
4.8 Optimierung der Prävasikularisierung mittels Zellinjektion.....	155
4.9 ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent.....	156
4.9.1 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die metabolische Aktivität <i>in vitro</i> .....	157
4.9.2 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die Gefäßausbildung <i>in vitro</i> .....	158
4.9.3 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die Ausbildung des Epithels <i>in vitro</i> .....	161
4.10 Das Überleben des Mundschleimhaut-Äquivalents <i>in vivo</i> .....	164
4.10.1 Mundschleimhaut-Äquivalente nach verschiedenen <i>in vitro</i> - Kultivierungszeiten auf der CAM.....	164
4.10.2 Mundschleimhaut-Äquivalente nach ESWT-Anwendung auf der CAM .....	167
4.11 Ausblick .....	170
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>188</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	188
6.2 Abbildungsverzeichnis .....	190
6.3 Tabellenverzeichnis .....	196
6.4 Werte der Abbildungen .....	197
6.5 Dissertationsbezogene Publikationen und Posterbeiträge.....	223
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>224</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>227</b>
<b>Eidesstaatliche Erklärung .....</b>	<b>229</b>

## I. Zusammenfassung

In der rekonstruktiven Chirurgie stellt ein *in vitro*-generiertes Mundschleimhaut-Äquivalent aus Patientinnen- und Patienten-eigenen Zellen als Transplantat bei Gewebedefekten eine Alternative zu autologem Gewebe dar. Die bestmögliche Ähnlichkeit mit nativem Gewebe ist für eine erfolgreiche *in vivo*-Anwendung unerlässlich. Diese Arbeit befasste sich mit der Herstellung und Analyse eines funktionalen Mundschleimhaut-Äquivalents zur personalisierten Geweberekonstruktion. Dabei wurde die Ausbildung einer effizienten Blutgefäßversorgung des Gewebes (Prävaskularisierung) sowie die Stimulation der Epithelausbildung angestrebt, um das Einheilen und Überleben des Mundschleimhaut-Äquivalents nach einer Transplantation *in vivo* zu gewährleisten.

Für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents wurden primäre Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen aus Patientinnen- und Patienten-Gewebe isoliert und als Tri-Kultur auf einer Kollagenmatrix kultiviert. Damit die Herstellung des Gewebe-Äquivalents in einer klinischen Anwendung individuell an die Patientinnen und Patienten angepasst werden kann, wurde die Verwendung von endothelialen kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus Vollblut mit der etablierten Anwendung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) aus juveniler Vorhaut verglichen. Die ECFC erlauben im Gegensatz zu den HDMEC eine minimalinvasive und autologe Isolationsmethode. Um ein besseres Verständnis über die interzelluläre, parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents zu erhalten, wurde die Sekretion von Zytokinen mittels ELISA analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Kultivierung mit Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent eine Herunterregulierung der Sekretion einer Vielzahl verschiedener Zytokine, wie VEGF, eNOS und Angiopoietin-2 verursachte. Bei der Analyse ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen HDMEC und ECFC feststellen.

Trotz der geringeren Zytokin-Verfügbarkeit bildete sich durch die Fibroblasten eine extrazelluläre Matrix aus. In der Anwesenheit der Fibroblasten erzeugten HDMEC an Kulturtag 26 eine oberflächliche Prävaskularisierung der Kollagenmatrix, welche sich bis Kulturtag 33 weiter ausprägte, nachgewiesen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Eine tiefgehende Prävaskularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents wurde angestrebt und sollte mithilfe von VEGF-121 angeregt werden. Eine gesteigerte Migration der Endothelzellen in Richtung des Zytokins konnte in der

Boyden-Kammer gezeigt werden. Jedoch erzielten verschiedene Chemotaxis-Versuche auf der Kollagenmatrix bisher keine tiefere Prävasikularisierung, welche weiterhin forciert werden sollte. Um diesem Problem zu begegnen, sollte ein chemotaktischer Reiz mittels kontrolliertem Aufbruch von Wachstumsfaktor-beladenen Nanopartikeln gesetzt werden. Obwohl die Herstellung der Nanopartikel erfolgreich war, konnte der Einsatz für die Herstellung eines chemotaktischen Gradienten im Mundschleimhaut-Äquivalent nicht realisiert werden. Die potenzielle Gewebeintegration wurde mit Hilfe des *Chorioallantoismembran-Assays in ovo* untersucht. Die oberflächliche Prävasikularisierung unterstützte die Epithelausbildung und -Erhaltung des Mundschleimhaut-Äquivalents *in ovo*. Dabei zeigten die ECFC ein vergleichbares Verhalten wie die HDMEC.

Die Ausbildung einer Epithelschicht konnte mittels immunhistochemischer Färbung bereits an Kulturtag 12 nachgewiesen werden. Diese bildete sich bis Kulturtag 33 weiter aus und nahm an Funktionalität zu. Die Ausbildung einer Basalmembran konnte ohne eine zusätzliche Stimulation nicht nachgewiesen werden. Durch die Anwendung einer extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT) an Kulturtag 19 konnte die *in vitro*-Ausbildung der Basalmembran sowie eine stärkere Ausbildung und Differenzierung des Epithels unterstützt werden. Dabei ließ sich ein Anstieg der metabolischen Zellaktivität nachweisen, untersucht mittels alamarBlue™-Assay. Bei Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen führte die *in vitro*-Anwendung zu einer besseren Epithelerhaltung während der *in ovo*-Kultivierung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Bei prävasikularisierten Mundschleimhaut-Äquivalenten führte die ESWT-Anwendung allerdings zu einer gegenseitigen Hemmung der Endothelzellen und der Epithelzellen *in ovo*.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche Verbesserung von patientinnen- und patientenindividuellen Mundschleimhaut-Äquivalenten für den autologen Gewebeersatz erzielt werden, indem eine Prävasikularisierung auch mit ECFC erreicht wurde und die Ausbildung der Epithelschicht sowie der Basalmembran mittels ESWT-Anwendung stimuliert werden konnte. Zudem wurde der Nutzen der Prävasikularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents gezeigt. Eine erfolgreiche Kombination der Prävasikularisierung und der ESWT-Anwendung könnte das effiziente Einwachsen, Überleben und die Funktionalität des Mundschleimhaut-Äquivalents in *in vivo*-Anwendungen gewährleisten.



## II. Abstract

In reconstructive surgery, an *in vitro* generated oral mucosa equivalent from the patient's own cells represents an alternative to autologous tissue as a graft for tissue defects. The best possible resemblance to native tissue is essential for successful *in vivo* application. This work addressed the generation and analysis of a functional oral mucosa equivalent for personalized tissue reconstruction. The aim was to form an efficient blood vessel supply to the tissue (prevascularization) and to stimulate epithelial formation to ensure healing and survival of the oral mucosa equivalent after transplantation *in vivo*.

For the generation of the oral mucosa equivalent, primary fibroblasts, endothelial cells, and epithelial cells were isolated from patient tissues and cultured as a tri-culture on a collagen matrix. In order to customize the generation of the tissue equivalent in a clinical application, the use of endothelial colony-forming progenitor cells (ECFC) from whole blood was compared with the established use of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) from juvenile foreskin. ECFC, in contrast to HDMEC, allow a minimally invasive and autologous isolation method. To gain a better understanding of the intercellular paracrine communication within the oral mucosa equivalent, the secretion of cytokines was analyzed by ELISA. This showed that culturing with epithelial cells in the oral mucosal equivalent caused downregulation of secretion of a variety of different cytokines, such as VEGF, eNOS, and angiopoietin-2. Analysis did not reveal a significant difference between HDMEC and ECFC.

Despite the lower cytokine availability, an extracellular matrix was formed by the fibroblasts. In the presence of the fibroblasts, HDMEC produced superficial prevascularization of the collagen matrix on culture day 26, which continued to develop until culture day 33, as detected by confocal fluorescence microscopy. A profound prevascularization of the oral mucosa skin equivalent was targeted and should be stimulated with the help of VEGF-121. Increased migration of endothelial cells toward the cytokine was demonstrated in the Boyden chamber. However, various chemotaxis experiments on the collagen matrix did not achieve deeper prevascularization so far, which should be further pushed. To address this issue, a chemotactic stimulus should be applied using controlled disruption of growth factor-loaded nanoparticles. Although the production of the nanoparticles was successful, the use for the production of a chemotactic gradient in the oral mucosal equivalent could not be realized. Potential

tissue–integration was investigated using the chorioallantoic membrane assay *in ovo*. Superficial prevascularization supported epithelial formation and maintenance of the oral mucosa equivalent *in ovo*. In this regard, ECFC showed comparable behavior to HDMEC.

The formation of an epithelial layer could be detected by immunohistochemical staining already on culture day 12. This continued to form until culture day 33 and increased in functionality. The formation of a basement membrane could not be detected without additional stimulation. The application of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) on culture day 19 supported the *in vitro* formation of the basement membrane as well as a stronger formation and differentiation of the epithelium. This allowed an increase in metabolic cell activity to be detected, examined by alamarBlue™ assay. In bi-cultures with fibroblasts and epithelial cells, *in vitro* application resulted in better epithelial maintenance during *in ovo* cultivation compared to untreated cultures. However, in prevascularized oral mucosa equivalents, ESWT application resulted in mutual inhibition of endothelial cells and epithelial cells *in ovo*.

Overall, this work significantly improved patient-specific oral mucosa equivalents for autologous tissue replacement by achieving prevascularization even with ECFC and stimulating the formation of the epithelial layer as well as the basement membrane by ESWT application. In addition, the benefit of prevascularization of the oral mucosal equivalent was demonstrated. Successful combination of prevascularization and ESWT application could ensure efficient ingrowth, survival, and functionality of the oral mucosa equivalent in *in vivo* applications.

# 1. Einleitung

## 1.1 Schleimhaut-Transplantate in der rekonstruktiven Chirurgie

Die rekonstruktive Chirurgie befasst sich mit der Wiederherstellung von Geweben in ihrer Form und ihrer Funktion innerhalb verschiedener medizinischer Fachgebiete (Lauer et al. 2008; Zugor et al. 2017). Das Erfordernis der chirurgischen Rekonstruktion kann durch erworbene Gewebedefekte wie zum Beispiel nach Tumorresektionen oder Unfällen, und auch durch angeborene Gewebedefekte, wie Fehlbildungen, verursacht werden. Die Rekonstruktion kann dabei für Knochen- und Knorpel- sowie Weichgewebe und epitheliale Gewebe notwendig werden (Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen e.V. 2022).

Die Schleimhaut ist ein epitheliales Gewebe, das die innere Oberfläche von Organen auskleidet, welche im Kontakt zur äußeren Umgebung stehen (Aumüller et al. 2014). Sie dient somit vor allem als Schutzschicht und findet sich unter anderem in der Mundhöhle, der Nasenhöhle, im Auge, im weiblichen sowie männlichen Urogenitalsystem und im Darm wieder (Reiß 2009; Müller 2012; Otto et al. 2013; Schmelz et al. 2014; Janni et al. 2022). Verschiedene autologe Schleimhäute dienen in den unterschiedlichen medizinischen Fachgebieten als Transplantate für jeweilige Gewebedefekte. Die Mundschleimhaut ist durch ihre Lokalisation in der Mundhöhle gut zugänglich und ähnelt anderen Schleimhautgeweben in ihrer Morphologie sehr. Dadurch eignet sie sich als Alternative für andere Schleimhautgewebe zur Anwendung bei Transplantationen (Markiewicz et al. 2007). In der Urologie wird die Transplantation von Mundschleimhaut als Goldstandard für Harnröhrenrekonstruktionen verwendet (Mungadi and Ugboko 2009). In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie kommen Patientinnen- und Patienten-eigene Mundschleimhaut-Transplantate zum Beispiel bei Zahnfleischwund oder nach Tumorresektionen zur Deckung der Wunde zum Einsatz (Toledano-Osorio et al. 2022). In der Augenheilkunde kommt autologe Mundschleimhaut als Transplantat bei Defekten der Augenoberfläche ebenfalls zur Anwendung (Mai et al. 2013). Auch in der Gynäkologie besteht nach Operationen an der Vagina Bedarf an Schleimhaut. In der Behandlung des Vaginalkarzinoms, bei dem es sich zu 83 % um Plattenepithelkarzinome handelt, müssen oft größere Bereiche der Vaginalschleimhaut entfernt werden (Kürzl 2010). Bei diesem Verfahren ist ein Einsatz von Mundschleimhaut zur Wundabdeckung ebenfalls denkbar.

Allerdings ist die Verfügbarkeit von nativem, autologem Mundschleimhautgewebe begrenzt. Zusätzlich kann die Entnahme von großflächigeren Mundschleimhaut-Proben Probleme für die Patientinnen und Patienten verursachen. So bedingt die Gewebeentnahme eine Verletzungen von gesundem Gewebe, was zu langfristiger Taubheit und Narbenbildung führen kann (Browne and Vanni 2017). Die *in vitro*-Generierung eines Mundschleimhaut-Äquivalents mittels *Tissue Engineering* unter Verwendung autologer, Patientinnen- und Patienten-eigener Zellen stellt eine geeignete Alternative zur Transplantation von nativer, autologer Mundschleimhaut dar (Maticescu et al. 2020).

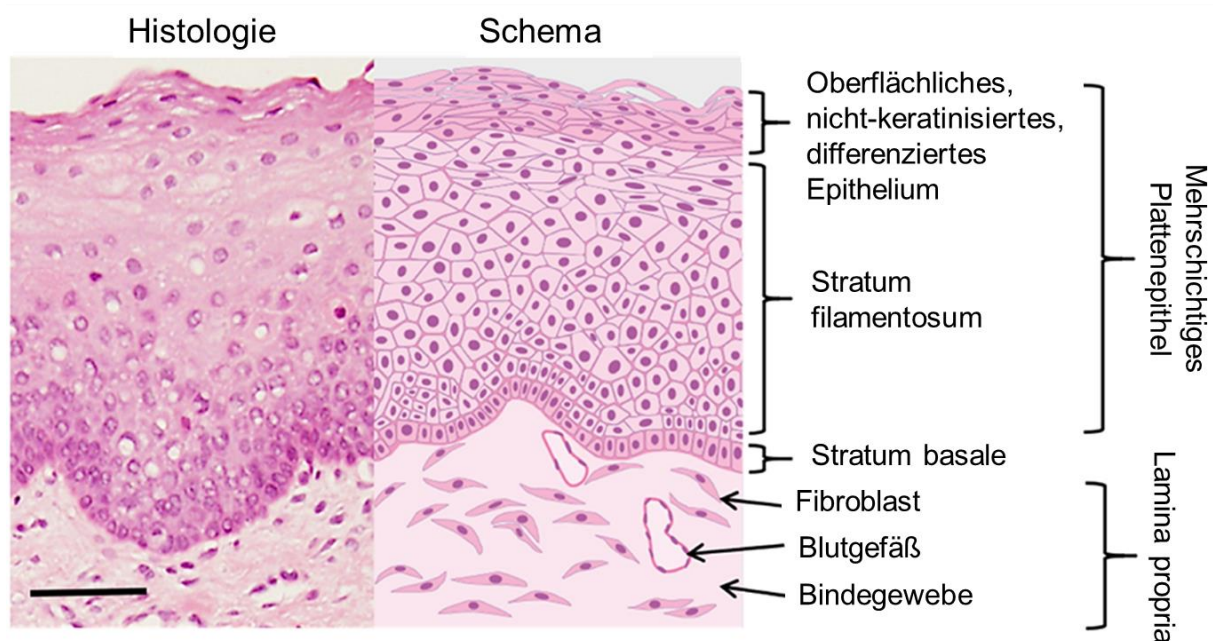
## 1.2 Die native Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut ist die Schleimhautschicht, die die Mundhöhle auskleidet. Sie fungiert als Barriere gegen externe Mikroorganismen und Krankheitserreger und schützt die darunter liegenden Gewebe vor äußeren mechanischen Einflüssen (Reinke and Sorg 2012; Squier and Brogden 2013). Eine charakteristische Aufgabe der Mundschleimhaut ist die Sekretion von Speichel, um ihre mit der Umwelt in Kontakt stehende Oberfläche feucht zu halten. Die Speichelproduktion findet in den großen Speicheldrüsen statt, welche weiter entfernt von der oberflächlichen Mundschleimhaut liegen. Die Sekretion durch die Mundschleimhaut erfolgt über viele kleine Speicheldrüsen, die unterhalb der Bindegewebsschicht (*Lamina propria*) in der Submukosa liegen (Squier and Brogden 2013).

Die Mundschleimhaut wird in die mastikatorische, die spezialisierte und die auskleidende Mundschleimhaut unterteilt. Die verschiedenen Mundschleimhauttypen unterscheiden sich in ihrem histologischen Aufbau und in ihrer Funktion. Die mastikatorische Mundschleimhaut bedeckt das Zahnfleisch und den harten Gaumen, die spezialisierte Mundschleimhaut bedeckt die Zunge. Die auskleidende Mundschleimhaut bedeckt die Wangen, den weichen Gaumen sowie die Lippeninnenseiten und somit die größte Fläche der Mundhöhle. Sie besitzt ein nicht-keratinisiertes Plattenepithel und kann eine Dicke von über 500 µm aufweisen (Nanci 2007; Müller 2012).

Das nicht-keratinisierte Plattenepithel ist mehrschichtig und unterteilt sich in das *Stratum basale*, das *Stratum filamentosum*, und das *Stratum distendum* (Groeger and

Meyle 2019) (Abbildung 1). Die Epithelzellen in der untersten Schicht besitzen ein hohes Proliferationspotenzial und teilen sich somit. Die neu gebildeten Zellen differenzieren und wandern passiv in die oberen Schichten. Die Proliferation und die Differenzierung werden durch Zytokine wie zum Beispiel *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  gesteuert. Die Zellen in den unterschiedlichen Epithelschichten weisen dadurch verschiedene Differenzierungsmuster auf (Squier and Kremer 2001). Die basale Epithelzellschicht enthält undifferenzierte, sich teilende Zellen, die in Clustern wachsen und Zytokeratin 19 exprimieren. In der darüber liegenden Schicht befinden sich differenzierte Epithelzellen, die Zytokeratin 13 exprimieren. Vollständig differenzierte Epithelzellen befinden sich in der äußersten Schicht. Diese Epithelzellen exprimieren Involucrin (Banks-Schlegel and Green 1981; Moll et al. 1982; Barrett et al. 1998; Squier and Kremer 2001).



**Abbildung 1: Aufbau von humaner, nativer Mundschleimhaut in histologischer und schematischer Darstellung.** Abbildung verändert nach Edmans et al. (Edmans et al. 2020).

Die Epithelzellen besitzen eine Zellpolarität und weisen eine apikale und eine basolaterale Seite auf (Torrás et al. 2018). Sie synthetisieren Proteine wie Kollagen IV und Laminin und bilden damit die Basalmembran, eine dünne Schicht aus extrazellulärer Matrix, aus. Das mehrschichtige Epithel liegt der Basalmembran auf. Durch diese wird das Epithel auf dem darunterliegenden Bindegewebe verankert. Die Basalmembran trägt damit zur Organisation und Stabilität des Gewebes bei und ist

maßgeblich für die Funktionalität des Epithels sowie des gesamten Mundschleimhaut-Gewebes (Yurchenco and Patton 2009; Yurchenco 2011). Die Funktionalität des Epithels wird außerdem über Zell-Zell-Interaktionen bestimmt. Dabei kann es sich um *Tight junctions*, *Adhaerens junctions*, *Desmosomen* und *Gap junctions* handeln. Die Integrität des Mundschleimhaut-Epithels wird durch die spezialisierten Verbindungen zwischen benachbarten Zellen und zwischen den Zellen und der Basalmembran erhalten. Es handelt sich dabei um stabile Verbindungen, die bei regenerativen Prozessen, wie zum Beispiel der Wundheilung, eine Umstrukturierung ermöglichen (Wan et al. 2018). Ein wesentlicher Bestandteil des Epithels sind *Tight junctions*, die die Barrierefunktion innerhalb des mehrschichtigen Epithels gewährleisten. Die *Tight junctions* werden von spezialisierten Transmembranproteinen wie Occludin gebildet, wodurch über die Ermittlung der Occludin-Expression innerhalb eines Epithels Rückschlüsse auf die Funktionalität geschlossen werden kann (van Rensburg 1995; Feldman et al. 2005).

Das unter der Basalmembran liegende Bindegewebe wird auch als *Lamina propria* bezeichnet (Brizuela and Winters 2022). Es bietet der Mundschleimhaut ebenfalls Stabilität sowie Flexibilität. Neben unter anderem Makrophagen und Mastzellen sind Fibroblasten der vorherrschende Zelltyp des Bindegewebes (Squier and Brogden 2013; Brizuela and Winters 2022). Diese sezernieren Zytokine und extrazelluläre Matrix (Midwood et al. 2004; Heller et al. 2020). Ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches sich für den Nachweis der Matrixbildung, sowie dem indirekten Nachweis von Fibroblasten eignet, ist Tenascin (Taylor et al. 1989). Das Bindegewebe ist, anders als das mehrschichtige Epithel, mit Blutgefäßen durchzogen, die das Epithel sowie das gesamte Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Brizuela and Winters 2022).

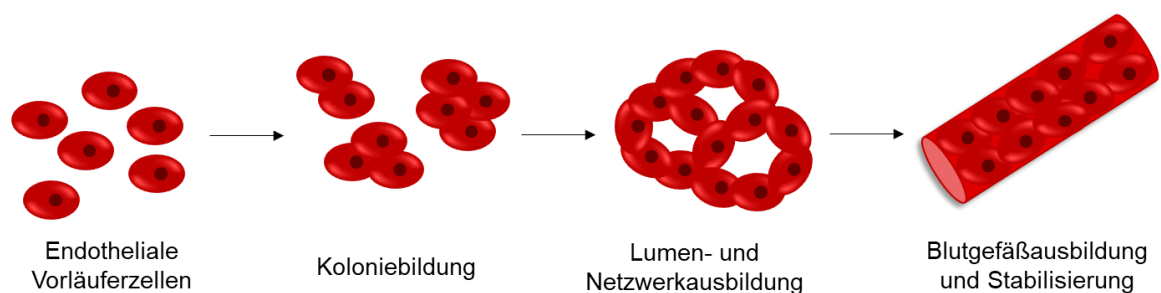
### 1.3 Gefäßbildung und gefäßbildende Zellen

Blutgefäße versorgen den gesamten Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen und sind für die Gewebe überlebensnotwendig. Bei Blutgefäßen unterscheidet man zwischen Arterien, Venen und Kapillaren. Bei Arterien und Venen handelt es sich um großlumige Gefäße, die mit einer Muskelschicht umgeben sind. Kapillaren sind feine Gefäßstrukturen mit einer einschichtigen und porigen Gefäßwand ohne Muskelschicht,

die einen Sauerstoff- und Nährstoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe ermöglichen (Lucius and Brockdorff 2016).

Die Vaskulogenese bezeichnet die Neubildung von Gefäßstrukturen aus endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, während der Embryogenese (Joussen et al. 2003). Dabei bilden endotheliale Vorläuferzellen zunächst Zellkolonien aus. Aus diesen Kolonien erfolgt eine Lumen- und Netzwerkausbildung. Aus diesem Netzwerk wiederum bilden sich die Blutgefäße, die sich durch eine Ausbildung einer Basalmembran verstärken und stabilisieren, bis hin zu einem reifen Gefäßsystem (Joussen et al. 2003) (Abbildung 2). Ein wichtiger Mediator bei der Vaskulogenese ist unter anderem der Wachstumsfaktor *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Patan 2000). An Zellkontakten von benachbarten Endothelzellen wird CD31, auch PECAM-1 genannt, in hohem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Protein hält die Integrität der Zellverbindungen aufrecht (Lertkiatmongkol et al. 2016).

#### Vaskulogenese



**Abbildung 2: Schema der Vaskulogenese.** Abbildung verändert nach Peak et al. (Peak et al. 2016). Das Copyright der Originalabbildung, welche als Vorlage verwendet wurde besitzt der Springer-Verlag.

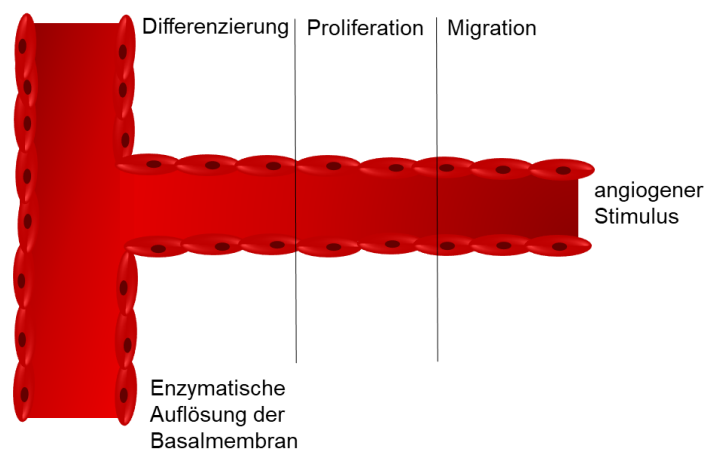
Die Angiogenese bezeichnet die Blutgefäßsprossung. Dabei sprossen Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen aus (Joussen et al. 2003) (Abbildung 3 A). Die Sprossung wird hauptsächlich durch VEGF, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) angeregt (Negri et al. 2019). Bei der Blutgefäßsprossung findet eine Differenzierung der Endothelzellen statt. Dabei erweitern sich die bereits bestehenden Gefäße und werden durchlässig. Die Basalmembran, der die Endothelzellen aufliegen wird enzymatisch aufgelöst. Proliferierende Endothelzellen migrieren dann in Richtung eines angiogenen Stimulus (Abbildung 3 B). Die extrazelluläre Matrix und Periendotheliale Zellen stabilisieren dabei das Gefäßsystem (Joussen et al. 2003). Diese Periendothelialen Zellen

differenzieren sich vermutlich aus Fibroblasten, die in einem direkten Kontakt mit den Endothelzellen stehen (Njauw et al. 2008). Funktionale Endothelzellen tragen intrazellulär das Protein von Willebrandfaktor (vWF). Das Fehlen oder Defekte von vWF führen zu Blutungsstörungen (Tschopp et al. 1974; Hoyer 1981; Ni et al. 2000).

### A Angiogenese



### B



**Abbildung 3: Schema der Angiogenese.** Abbildung verändert nach Peak et al. (Peak et al. 2016) und Jousseen et al. (Jousseen et al. 2003). Das Copyright der Originalabbildungen, welche als Vorlagen verwendet wurde besitzt der Springer-Verlag.

Nicht nur im embryonalen Organismus findet Vaskulogenese statt. Das Wachstum von Gefäßen im erwachsenen Organismus, beispielsweise bei einer Wundheilung, kann als eine Kombination aus Vaskulogenese und Angiogenese betrachtet werden. An dieser Vaskulogenese im erwachsenen Organismus sind endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*; EPC) beteiligt, die im Blut zirkulieren (Jousseen et al. 2003).

Die im Blut zirkulierenden EPC können zu adulten Endothelzellen differenzieren. Die adulten Endothelzellen sind wiederum in der Lage Blutgefäße auszubilden (Asahara et al. 1997; Lin et al. 2000). Die Vorläuferzellen lassen sich unterteilen in frühe und späte EPC (Hur et al. 2004). Die frühen EPC werden auch als myeloide angiogene



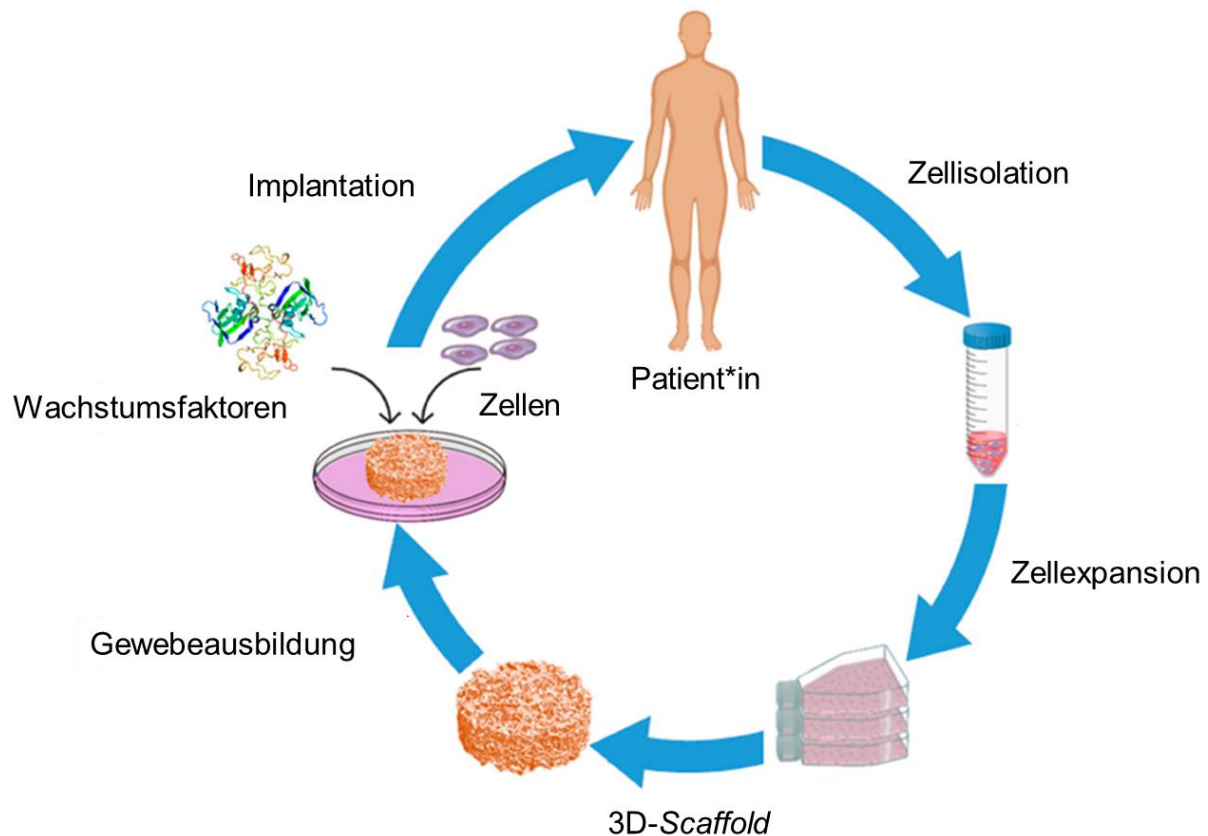
Zellen (MAC) bezeichnet und identifiziert. Diese können nicht zu adulten Endothelzellen differenzieren (Medina et al. 2011). Oft ist bei den frühen EPC auch von *circulating angiogenic cell* (CAC), proangiogene hämatopoetische Stammzellen (PAC) oder *colony forming unit-Hill cells* (CFU-Hill) die Rede (Medina et al. 2017). Die späten EPC werden auch als *endothelial colony forming cells* (ECFC) bezeichnet. ECFC sind im Gegensatz zu den anderen Untertypen proliferationsfähig und in der Lage Gefäßstrukturen *de novo* auszubilden (Critser and Yoder 2010; Tasev et al. 2016). Frühe und späte EPC prägen teilweise unterschiedliche Oberflächenmarkern aus, wodurch sich diese mittels Fluoreszenzfärbung der jeweiligen Marker charakterisieren lassen. Die frühen EPC prägen auf ihrer Zelloberfläche CD14 und CD133 aus, während ECFC dies nicht tun (Peichev et al. 2000; Medina et al. 2017). CD31 wird von allen Untertypen der EPC ausgeprägt und dient als allgemeiner Endothelzellmarker (Medina et al. 2017).

Bei der Herstellung von Gewebe-Äquivalenten mittels *Tissue Engineering* ist es wichtig, eine schnelle Blutgefäßanbindung an das Gefäßsystem des Empfängerorganismus zu gewährleisten, um die Versorgung des Gewebes nach einer Transplantation mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherzustellen.

#### 1.4 Die *in vitro*-Herstellung von Geweben aus autologen Zellen

*Tissue Engineering* bezeichnet die *in vitro*-Herstellung von Geweben aus autologen Zellen und dient der Herstellung von Gewebe-Äquivalenten als Alternative zur Verwendung von autologem Gewebe in der rekonstruktiven Chirurgie (Vacanti and Langer 1999). Das *Tissue Engineering* gewinnt in der rekonstruktiven Medizin zunehmend an Bedeutung, da es funktionale Transplantate für den Ersatz von beschädigten oder fehlenden Geweben und Organen liefern kann. Die Forschung im Bereich des *Tissue Engineerings* nimmt dementsprechend rasant zu. In den letzten zehn Jahren hat sich der *Output* an publizierten Ergebnissen in diesem Feld mehr als verdreifacht (Quelle Pubmed, Suchbegriff: *Tissue Engineering*, Suchergebnisse Stand 25.08.2022). Die *in vitro*-Herstellung von Geweben im Labor sowie der Einsatz der künstlichen Gewebe, ist für verschiedenste Gewebearten und Anwendungen interessant.

Dafür werden autologe Zellen aus Patientinnen- und Patienten-Proben, wie zum Beispiel kleinen Gewebebiopsaten oder Blut, isoliert. Die isolierten, sogenannten Primärzellen, können je nach Zelltyp und Isolationsmethode differenziert und expandiert werden. Um Gewebe-Äquivalente herzustellen, werden die jeweiligen Zellen auf beziehungsweise in 3D-*Scaffolds* gegeben, um dort als 3D-Konstrukt Gewebe-Äquivalente ausbilden zu können (Asadian et al. 2020). Bei *Scaffolds* handelt es sich um Trägermaterialien, die sich je nach Anwendung und Art der Zellen unterscheiden. So können diese eines synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein und aus verschiedenen Materialien bestehen, wie zum Beispiel aus Kollagen, Fibrin oder Gelatine. Sie können in unterschiedlichen Formen mit unterschiedlichen Strukturen auftreten, wie zum Beispiel als Membran, Schwamm oder Gel (Wu and Elisseff 2014). Das Auftragen oder Einbringen der Zellen in Trägermaterialien kann sowohl durch Pipettieren oder auch mithilfe eines 3D-Biodruckers in Biotinten erfolgen (Dey and Ozbolat 2020). Die Zellen proliferieren und differenzieren in der 3D-Umgebung und können je nach Anwendung behandelt und beeinflusst werden. So besteht die Möglichkeit den Zellen Wachstumsfaktoren oder andere Reize zuzufügen, um die Differenzierung und Entwicklung des Gewebe-Äquivalents zu beeinflussen. Auch können weitere Zelltypen dem Konstrukt zu verschiedenen Zeitpunkten hinzugefügt werden. Die *in vitro*-generierten Gewebe-Äquivalente können nach einer variablen Kultivierungszeit in Tiermodellen auf ihre Funktionalität untersucht und langfristig in den Empfängerorganismus zur klinischen Anwendung implantiert werden (Asadian et al. 2020) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Entwicklungsprozesses im *Tissue Engineering*.**  
Abbildung verändert nach Asadian et al. (Asadian et al. 2020).

Die Verwendung von autologen Zellen aus Patientinnen- und Patienten-Gewebe ermöglicht zum einen die Herstellung von sicheren Transplantaten, die ein geringes Risiko der Abstoßung oder Fremdkörperreaktion aufweisen, da nur klinisch zugelassene Trägermaterialien und körpereigene Zellen für die Implantation in die Patientinnen und Patienten verwendet werden können. Zum anderen können die Transplantate individuell nach der jeweiligen Anwendung sowie in ihrer Form und Größe angepasst werden (Fodor 2003).

Der Übergang von den *in vitro*-Arbeiten und Untersuchungen im Labor hin zur klinischen Anwendung ist jedoch ein komplizierter und zeitaufwändiger Prozess. Während dieses Prozesses muss erreicht werden, dass die Gewebe-Äquivalente eine physiologische Wirksamkeit und Funktionalität aufweisen und diese auch nach der Transplantation beibehalten wird. Des Weiteren muss die Sicherheit der Empfänger\*innen streng gewährleistet werden. Ein limitierender Faktor bei der Herstellung und Anwendung von *in vitro*-generierten Gewebe-Äquivalenten ist die unzureichende Vaskularisierung der Gewebe. Dies kann bei der *in vivo*-Anwendung

zu einem Absterben der Gewebe aufgrund von mangelnder Sauerstoff- und Nährstoffversorgung führen (Amirsadeghi et al. 2020).

Bisher wurde eine Reihe von Schleimhaut-Äquivalenten mit Epithelzellen als Monokultur oder in Bi-Kultur mit Fibroblasten hergestellt. Sie variieren in der Art der Fibroblasten- und Epithelzelltypen und auch in der Art des Trägermaterials. (Almansoori et al. 2020). Nur wenige Studien befassten sich mit einer Prävaskularisierung, der Ausbildung von Gefäßstrukturen innerhalb der Schleimhaut-Äquivalente während des Herstellungsprozesses, mittels Endothelzellen (Masson-Meyers et al. 2022). Bei diesen Ansätzen kann es zu einer fehlenden oder verzögerten Gefäßversorgung nach der Transplantation *in vivo* kommen. Eine Prävaskularisierung kann dieses Problem umgehen und ist somit von großer Notwendigkeit.

### 1.5 Die Prävaskularisierung von *in vitro*-Geweben

Um die Anbindung und die Überlebenschancen von Gewebe-Äquivalenten in der *in vivo*-Anwendung zu unterstützen, ist es von bedeutendem Vorteil, wenn die Gewebe während ihrer Herstellung prävaskularisiert werden (Laschke and Menger 2016). Die Prävaskularisierung ermöglicht eine schnellere Anastomose an das Gefäßsystem der Empfängerorganismen und verringert das Nekrose-Risiko nach der Transplantation (Tremblay et al. 2005; Unger et al. 2010). Die Diffusionsgrenze für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in Geweben liegt bei etwa 200  $\mu\text{m}$  (Torres Filho et al. 1994). Da die zu erzeugenden Mundschleimhaut-Äquivalente etwa 500  $\mu\text{m}$  dick sind, kann die Versorgung des Epithels in den ersten Tagen *in vivo* nicht ohne vorgeformte Gefäße in Form der Prävaskularisierung sichergestellt werden. Die Prävaskularisierung wird mittels Endothelzellen gestaltet. Diese sind Schlüsselkomponenten im *Tissue Engineering*, da sie für die Vaskulogenese und die Angiogenese zuständig sind (Heller et al. 2016; Sturtzel 2017; Amirsadeghi et al. 2020).

Es gibt verschiedene Strategien innerhalb des *Tissue Engineerings* Prävaskularisierung zu erzeugen (Shafiee et al. 2021). Verschiedene Endothelzelltypen können dabei als Quelle verwendet werden. Dabei bieten sich zum Beispiel reife Endothelzellen aus juveniler Vorhaut (*human dermal microvascular endothelial cells*, HDMEC) und der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*; HUVEC), oder endotheliale Vorläuferzellen aus dem Blut für die

Prävaskularisierung an (Heller et al. 2016; Benning et al. 2018; Guo et al. 2018). Bei HDMEC handelt es sich um mikrovaskuläre Endothelzellen, welche sich als Modellzellen zur Gefäßbildung im *Tissue Engineering* aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Gefäßstrukturen *in vitro* und ihrer einfachen Handhabung etabliert haben (Walser et al. 2013; Heller et al. 2016). Ebenso HUVEC, die großlumige Gefäße ausbilden, haben sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Isolation mit großer Zellausbeute im *Tissue Engineering* als Modellzellen etabliert (Kocherova et al. 2019). Bei den aus dem venösen Vollblut isolierbaren EPC eignet sich nur die Untergruppe der *endothelial colony forming cells* (ECFC) als endotheliale Quelle für die Prävaskularisierung, da diese im Gegensatz zu den anderen Untertypen proliferationsfähig und in der Lage sind Gefäßstrukturen *de novo* auszubilden (Critser and Yoder 2010; Tasev et al. 2016). Es ist auch möglich aus mesenchymalen Stammzellen Endothelzellen für die Prävaskularisierung zu differenzieren (Xu et al. 2019).

Für die Ausbildung einer erfolgreichen Prävaskularisierung ist es wichtig während der Herstellung der Gewebe-Äquivalente Kulturbedingungen zu schaffen, die für den Prozess der Prävaskularisierung optimal sind. Mittels des Zellkulturmediums können und müssen Konditionen geschaffen werden, die diesen Prozess positiv beeinflussen. Hierfür können Zellkulturmedien beispielsweise VEGF und bFGF zugesetzt werden. Diese Wachstumsfaktoren stimulieren die Endothelzellen zur Ausbildung von Gefäßen (Drake et al. 2000; Mizia-Malarz et al. 2008; Heller et al. 2020).

Die Prävaskularisierung von 2D-Kulturen, gestaltete sich bereits erfolgreich. Dabei bildeten Endothelzellen in einem Zellmonolayer gefäßartige Strukturen aus. Hindernisse bestehen noch in der Herstellung von komplexeren 3D-Konstrukten (Liew and Zhang 2017). Endothelzellen können dabei auf beziehungsweise in Trägermaterialien ausgesät und kultiviert werden. Sie organisieren sich selbst in einer geeigneten Umgebung mit den notwendigen Wachstumsfaktoren und bilden Gefäßstrukturen aus. Dies gelang allerdings nur in oberflächlichen Bereichen oder sehr kleinen Konstrukten (Heller et al. 2016). Eine beliebte Methode ist es, Trägermaterialien mit Kanälen zu versehen, welche mit Endothelzellen besiedelt werden können, die dann wiederum diese Hohlräume auskleiden (Zhang et al. 2015). Vor allem im Bereich des 3D-Biodrucks ist dies eine viel genutzte Methode. Im 3D-Biodruck ergibt sich außerdem die Möglichkeit die Endothelzellen direkt im

Trägermaterial, der Biotinte, zu drucken oder die Gefäßausbildung mit angiogenen Faktoren anzuregen (Papaioannou et al. 2019; Chen et al. 2021). Das Mischen der Zellen in Biotinten bietet den Vorteil, dass die Endothelzellen nach dem 3D-Biodruck direkt im gesamten Konstrukt verteilt vorliegen und dort Gefäßstrukturen ausbilden können. Auch auf festen Trägermaterialien wird die Stimulation der Endothelzellen mit angiogenen Faktoren eingesetzt (Lopes et al. 2021). Um die Ausbildung von Gefäßstrukturen aus Endothelzellen zu unterstützen können je nach Anwendungsgebiet und Trägermaterial Zellsphäroide genutzt werden, um einen näheren Zell-Zellkontakt herzustellen und den Endothelzellen eine dreidimensionale Umgebung zu schaffen (Walser et al. 2013). Eine weitere vielversprechende Methode zur Prävaskularisierung konnte mithilfe des sogenannten *cell sheet engineerings* erzielt werden. Diese Methode ermöglicht das Ernten von intakten Zellschichten aus temperaturabhängigen Kulturschalen. Für die Prävaskularisierung wurden Zellschichten aus Endothelzellen mit Zellschichten aus Fibroblasten zu dreischichtigen Konstrukten gestapelt. In den Konstrukten bildeten sich Gefäßstrukturen aus (Asakawa et al. 2010). In einem Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Prävaskularisierung von *in vitro*-Gewebe nach der Transplantation eine schnellere Gefäßausbildung innerhalb der Gewebe-Äquivalente unterstützt und die Gefäße der Prävaskularisierung Anbindung an das murine Gefäßsystem fanden und somit funktional waren (Jakubowska et al. 2020).

Die meisten Forschungsarbeiten zur Prävaskularisierung befassen sich mit Mono-Kulturmodellen aus Endothelzellen auf einem Trägermaterial oder mit Bi-Kulturmodellen aus Endothelzellen zusammen mit einem weiteren Zelltyp. So werden zum Beispiel für einen Knochenersatz Endothelzellen und mesenchymale Stammzellen zusammen kultiviert (Klotz et al. 2018). Nur wenige Arbeitsgruppen befassen sich mit mehr als zwei Zelltypen oder der Prävaskularisierung speziell von Mundschleimhaut-Äquivalenten (Masson-Meyers et al. 2022). Bei dem in dieser Arbeit hergestellten Mundschleimhaut-Äquivalent handelt es sich um ein komplexeres Äquivalent aus einer Tri-Kultur mit drei Zelltypen inklusive Endothelzellen zur Prävaskularisierung in einem dreidimensionalen *Scaffold*.

## 1.6 Epithelgewebe-Herstellung im *Tissue Engineering*

In der klinischen Anwendung im Bereich des Ersatzes von nativer Mundschleimhaut oder Haut sind bisher ausschließlich azelluläre, kommerziell erhältliche Ersatzmaterialien im Einsatz (Becker et al. 2009; Beier et al. 2021; Pabst et al. 2022).

Zu Beginn der Herstellung von zellularisierten Epithelgewebe-Äquivalenten im *Tissue Engineering* wurden bislang hauptsächlich 2D-Kulturen, also Zellmonolayer, hergestellt, welche hilfreiche Informationen für die Forschung dieses Bereiches des *Tissue Engineerings* liefern konnten, jedoch nur begrenzt physiologische Fähigkeiten ausbildeten. Die Herstellung von 3D-Konstrukten in der Herstellung von *in vitro*-generierten Haut- und Schleimhautgeweben ist unerlässlich um den Fortschritt in diesem Bereich auszubauen (Baker and Chen 2012; Zurina et al. 2018).

Die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels ist ein komplexer Prozess, bei dem die Proliferation und die Differenzierung der Epithelzellen eine große Rolle spielt. Die Ko-Kultivierung mit Fibroblasten oder mesenchymalen Stammzellen schafft ein geeignetes Umfeld für die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen und kann somit diese Prozesse unterstützen (Vrana et al. 2008; Liu et al. 2011). Für die Funktionalität der Epithelgewebe ist es notwendig, dass während der *in vitro*-Herstellung eine Basalmembran ausgebildet wird (Hajicharalambous et al. 2009). Die Ausbildung der Basalmembran kann durch die Selbstorganisation der Epithelzellen gebildet oder zusätzlich durch eine Beschichtung des Trägermaterials zum Beispiel mit Laminin unterstützt werden (Neal et al. 2009; Vrana et al. 2013).

Eine Strategie Hautgewebe herzustellen ist die *Scaffold* basierte Kultivierung. Hierfür werden oftmals Keratinozyten und Fibroblasten auf einem Trägermaterial kultiviert, bei dem es sich zum Beispiel um Kollagenmatrices oder Matrigel handeln kann (Basso et al. 2018). Ein Großteil von Hautgeweben im *Tissue Engineering* wird unter der Verwendung von Bi-Kulturen mit Keratinozyten und mesenchymalen Stammzellen hergestellt (Sierra-Sánchez et al. 2021). Es wurden bereits prävascularisierte Hautkonstrukte hergestellt, die aus Keratinozyten, Fibroblasten und HUVEC bestanden. Für die Herstellung dieses Hautmodells wurden die Fibroblasten mit einer speziellen Technik mit Fibronectin und Gelatine beschichtet und mit HUVEC zusammen in dem Well einer 12-Well-Platte kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit einer Kollagen IV-Lösung bedeckt und das Gel mit Keratinozyten beschichtet. Die Konstrukte wurden sieben Tage kultiviert, wobei die Keratinozyten

durchgehend an der Luftgrenze waren. Nach der Transplantation in ein Mausmodell, hatten die prävasikularisierten Hautkonstrukte eine frühere Anbindung an das murine Gefäßsystem und eine höhere Überlebensrate als nicht-prävasikularisierte Hautkonstrukte (Miyazaki et al. 2019).

Für die Herstellung von Mundschleimhautgewebe werden in den meisten Studien Epithelzellen in einer Ko-Kultur mit Fibroblasten aus der Mundschleimhaut verwendet. Dabei werden teilweise frisch isolierte Primärzellen oder immortalisierte Zellen verwendet. Als Trägermaterialien können unter Anderem azelluläre, kommerziell erhältliche *Scaffolds* verwendet werden. Des Weiteren werden verschiedene natürliche Kollagen- und Fibrin-basierte *Scaffolds* oder auch synthetisch hergestellte Trägermaterialien genutzt (Ramis and Joana 2018; Almansoori et al. 2020). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bi-Kulturen mit Keratinozyten und Fibroblasten in der Lage sind *in vitro* ein geschichtetes Epithel, eine Basalmembran sowie fibroblastenhaltiges Bindegewebe auszubilden, was histologisch nativer Mundschleimhaut ähnelt (Moharamzadeh et al. 2008; Said et al. 2019). Mundschleimhaut-Äquivalente, die zusätzlich prävasikularisiert sind, werden, wie bereits erwähnt, kaum beforscht.

Bereits bei der *in vitro*-Herstellung von Mundschleimhaut-Äquivalenten aus autologen Zellen unterstützende Konditionen für die Ausbildung und Differenzierung des Epithels und der Basalmembran zu schaffen, könnte die Funktionalität und die Überlebenschancen nach einer Transplantation *in vivo* erhöhen. Eine Möglichkeit, die Ausbildung und somit die Funktionalität eines mehrschichtigen Epithels während der Herstellung eines Mundschleimhaut-Äquivalents anzuregen, ist die Anwendung von extrakorporaler Stoßwellentherapie (ESWT). In der klinischen Anwendung ist die ESWT eine etablierte Behandlungsmethode, die bei verschiedenen orthopädischen und Weichgewebeerkrankungen eingesetzt wird, um Heilungsprozesse zu unterstützen. Über die Auswirkungen der ESWT auf die Regeneration von Weichgewebe ist noch wenig bekannt (Schaden et al. 2007; Mittermayr et al. 2012; Auersperg and Trieb 2020). In einem Tiermodell mit Ratten und auf der Chorioallantoismembran (CAM) des Huhns hat sich gezeigt, dass die ESWT-Anwendung positive Auswirkungen auf die Angiogenese und die Epithelbildung besitzt (Lima Morais et al. 2019; Heimes et al. 2020). Die *in vitro*-Anwendung von ESWT könnte somit die Ausbildung und Differenzierung des mehrschichtigen Epithels der



Mundschleimhaut-Äquivalente während des Herstellungsprozesses verbessern. Bei Stoßwellen handelt es sich um mechanische, nichtlineare Druckwellen, die sich in einem flüssigen Medium ausbreiten (Auersperg and Trieb 2020). Die Stoßwellen werden in der Regel durch Aufsetzen eines Metallapplikators auf das betroffene Gewebe appliziert (Auersperg and Trieb 2020). Die Anregung der Geweberegeneration könnte darin begründet sein, dass die mechanische Belastung der Zellen zu einer erhöhten Zellproliferation und erhöhten Proteinsynthese, zum Beispiel von Kollagen I führt (Khan and Scott 2009; Vetrano et al. 2011). Die genauen Mechanismen hinter der ESWT sind unbekannt.

### 1.7 Das *in vitro*-prävascularisierte Mundschleimhaut-Äquivalent

Der klinische Bedarf einer *in vitro*-generierten Mundschleimhaut mittels *Tissue Engineering* als Alternative zu autologer Mundschleimhaut zur Transplantation ist gegeben und seit längerem bekannt (Moharamzadeh et al. 2012). Meine Arbeitsgruppe hat in Vorarbeiten bereits einige Erkenntnisse zur Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents erarbeitet, auf welche in dieser Arbeit aufgebaut wird. In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse aus den Vorarbeiten zu unserem Mundschleimhaut-Äquivalent aus meiner Arbeitsgruppe beschrieben.

Das Mundschleimhaut-Äquivalent kann aus einer Tri-Zellkultur auf einer Kollagenmatrix (Bio-Gide®) unter Verwendung von primären Fibroblasten und Epithelzellen aus der Mundschleimhaut in Kombination mit primären mikrovaskulären Endothelzellen aus juveniler Vorhaut erzeugt werden (Heller et al. 2016). Die Kollagenmatrix besteht aus porzinem Kollagen Typ I und III und besitzt eine bilayer Struktur. Dabei besteht die Matrix aus einer glatten, zelloklusiven Seite und einer porösen Seite (Schwarz et al. 2006). Die glatte Seite eignet sich zur Auflagerung von Zellen. Die poröse Seite erlaubt die Migration von Zellen in das Innere der Kollagenmatrix und das Einwachsen von Gefäßstrukturen. Durch die bilayer Kollagenstruktur kann die Ausbildung einer Bindegewebsschicht mit integrierten Endothelzellen beziehungsweise Gefäßstrukturen sowie einer aufliegenden Epithelschicht erzeugt werden (Schwarz et al. 2006; Heller et al. 2016). Die Verwendung eines Transwell-Systems bei der Kultivierung der Zell-besiedelten Kollagenmatrix ermöglicht den Epithelzellen eine Kultivierung an der Luftgrenze des Zellmediums. Die Bio-Gide®-Kollagenmatrix weist eine Dicke von ca. 500 µm auf und

ist bereits für den klinischen Einsatz zur Deckung von Knochendefekten in der Oralchirurgie anwendbar (Tal et al. 2008). Verschiedene andere Kollagen-basierte *Scaffolds* für die Herstellung unseres Mundschleimhaut-Äquivalents wurden im Vergleich zu der Bio-Gide® getestet. Dafür wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen hergestellt. Die *Scaffolds* unterschieden sich in der Zusammensetzung des Kollagens, sowie dessen tierischer Quelle (porcin oder equin). Die Zellen waren vital und bildeten auf allen getesteten *Scaffold*-Varianten ein mehrschichtiges Epithel aus. Auf der Bio-Gide®-Matrix zeigte sich die beste Tenascin-Sekretion sowie die tiefste Fibroblasten-Migration in die Kollagenmatrix hinein. Dies ist wichtig für die Ausbildung von Gefäßstrukturen im prävasikularisierten Mundschleimhaut-Äquivalent (Schwab et al. 2021). Die anatomische Struktur und die Funktion des Mundschleimhaut-Äquivalents soll möglichst konform mit der von nativer, autologer Mundschleimhaut sein.

In weiteren Vorarbeiten wurde herausgearbeitet, dass für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents die Fibroblasten als erster Zelltyp an Kulturtag 1 auf die Kollagenmatrix aufgebracht werden sollten. Die Fibroblasten sezernieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die vor allem für die Prävasikularisierung förderlich sind (Bauer 2018). Außerdem dienen die Fibroblasten der Ausbildung der extrazellulären Matrix und bilden damit das notwendige Bindegewebe aus (Sorrell et al. 2007). Außerdem wurde bereits ermittelt, dass die Epithelzellbesiedlung an Kulturtag 4 und die Endothelzell-Besiedlung an Kulturtag 12 erfolgen sollte (Bauer 2018). Die ersten Untersuchungen der parakrinen Zellkommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents ergaben, dass eine Mono-Kultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmatrix innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung mehr VEGF sezernierte als eine Bi-Kultur mit HDMEC und Fibroblasten. Ab Kulturtag 3 bis hin zu Kulturtag 21 sezernierte die Bi-Kultur mit HDMEC und Fibroblasten mehr VEGF als die Mono-Kultur. Die VEGF-Sekretion einer HDMEC-Mono-Kultur blieb über die gesamte Kultivierungsdauer hinweg sehr niedrig. Die Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und bFGF wurden in den ersten Stunden der Kultivierung der Bi-Kultur mit HDMEC und Fibroblasten mehr sezerniert als bei der Mono-Kultur mit HDMEC oder Fibroblasten. Zwischen Kulturtag 3 und 21 überstieg die IL-8- und bFGF-Sekretion der Mono-Kultur mit Fibroblasten die Sekretion der Bi-Kultur (Heller et al. 2020).

Die Prävascularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vitro* konnte durch mikrovaskuläre Endothelzellen aus juveniler Vorhaut erzielt werden. Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix wurden im Mausmodell getestet. Eine Anastomose mit dem Blutgefäßsystem der Maus wurde nach 5 Tagen ermöglicht (Heller et al. 2016). Die Prävascularisierung war jedoch nur in oberflächlichen Bereichen des Mundschleimhaut-Äquivalents auf der gegenüberliegenden Seite des Epithels und nicht in tieferen Bereichen der Kollagenmatrix lokalisiert (Bauer 2018). Dies könnte bei der *in vivo*-Anwendung des Mundschleimhaut-Äquivalents, bestehend aus der Tri-Kultur mit Epithelzellen dazu führen, dass die Epithelschicht über die erzeugten Gefäße nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden kann. Daher muss eine Strategie entwickelt werden, um das Problem einer fehlenden tiefgehenden Gefäßausbildung zu überwinden. Ein „Reinziehen“ der Endothelzellen in die Kollagenmatrix mittels Kapillarkräfte oder die Zentrifugation der Endothelzellen in die Matrix, waren in Vorarbeiten bereits nicht erfolgreich. Die direkte Applikation von angiogenen Wachstumsfaktoren, während der Besiedlung der Endothelzellen auf die Kollagenmatrix, zeigte ebenfalls nicht das gewünschte Ergebnis einer erfolgreichen tiefgehenden Prävascularisation. Die Injektion der Endothelzellen in die Kollagenmatrix könnte eine erfolgsträchtige Strategie sein. Hierbei wird allerdings die Matrix beschädigt und die Auswirkung der mechanischen Prozedur auf das Epithel und die Basalmembran sind noch nicht geklärt (Bauer 2018).

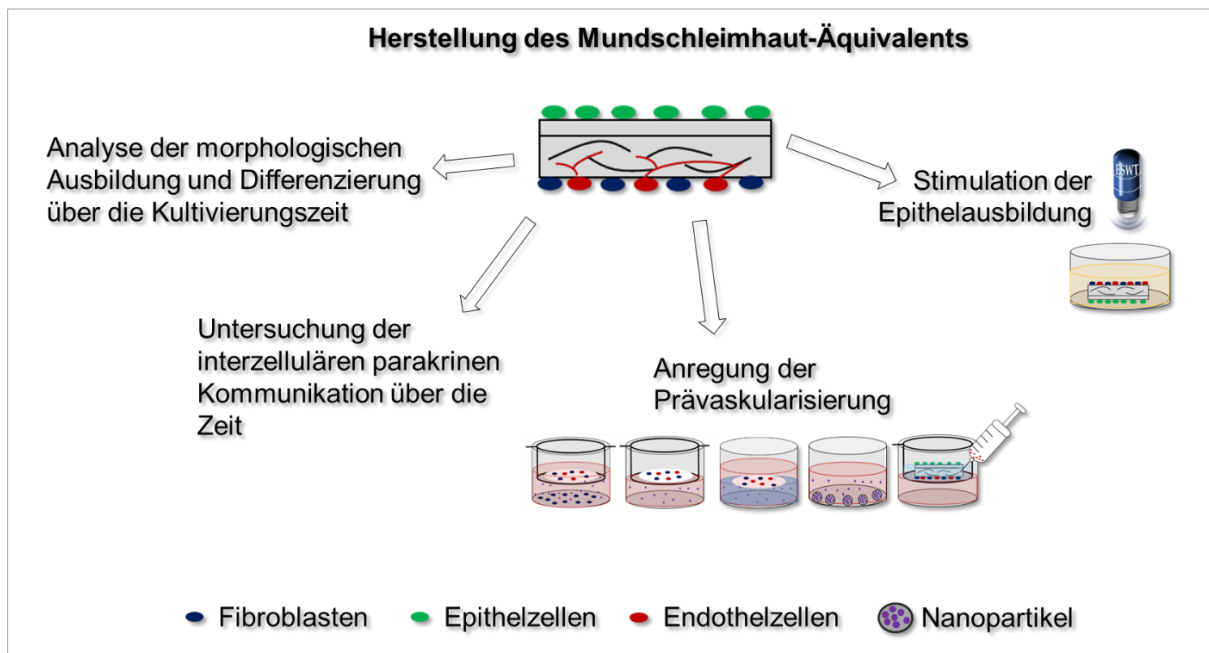
Um die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents auf die klinische Anwendung mit autologen Zellen, individuell für alle Patientinnen und Patienten vorzubereiten ist es des Weiteren notwendig zu den Etablierungs- und Optimierungsversuchen mit HDMEC aus juveniler Vorhaut die Herstellung unter der Verwendung von endothelialen kolonieformenden Vorläuferzellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC), welche minimalinvasiv aus dem peripheren Blut isoliert werden können, zu etablieren. Hinsichtlich der parakrinen Zellkommunikation von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und ECFC im Vergleich zu Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC ließ sich durch Vorarbeiten bereits erkennen, dass sich beide Endothelzelltypen auf der Kollagenmatrix im Hinblick auf die Zytokin-Sekretion sehr ähnlich verhielten (Bader 2021). Auch die ECFC waren in einer Bi-Kultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmatrix in der Lage eine oberflächliche Prävascularisierung auszubilden (Schulze 2016).

## 1.8 Zielsetzung

In der rekonstruktiven Chirurgie kann autologe Mundschleimhaut zur Wiederherstellung verschiedener Gewebe nach erworbenen oder angeborenen Gewebedefekten verwendet werden. Da die Verfügbarkeit von nativer, autologer Mundschleimhaut jedoch begrenzt ist und die Entnahme größerer Gewebeproben zu Problemen für die Patientinnen und Patienten führen kann, ist der Bedarf eines *in vitro*-generierten Mundschleimhaut-Äquivalents aus Patientinnen- und Patienten-eigenen Zellen als alternatives Transplantat mittels *Tissue Engineering* groß. Eine bestmögliche Ähnlichkeit mit nativem Gewebe ist für eine sichere und erfolgreiche *in vivo*-Anwendung unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war es ein funktionales Mundschleimhaut-Äquivalent mit einer Tri-Kultur aus Patientinnen- und Patienten-eigenen Zellen auf einer Kollagenmatrix herzustellen und dessen morphologische Ausbildung und interzelluläre, parakrine Kommunikation während der Kultivierungszeit genauer zu analysieren. Außerdem sollte die Stimulation einer effizienten, tiefgehenden Prävasikularisierung sowie die Stimulation der Epithelausbildung erzielt werden, um das Einheilen und Überleben des Mundschleimhaut-Äquivalents nach einer Transplantation *in vivo* gewährleisten zu können. Damit die Herstellung des Gewebe-Äquivalents in einer klinischen Anwendung individuell an die Patientinnen und Patienten angepasst werden kann und einer personalisierten Geweberekonstruktion dient, sollte die Verwendung von endothelialen kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus Vollblut mit der im Mundschleimhaut-Äquivalent etablierten Anwendung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) aus juveniler Vorhaut verglichen werden. Die ECFC erlauben im Gegensatz zu den HDMEC eine minimalinvasive und autologe Isolationsmethode. Bei der Betrachtung der morphologischen Entwicklung des Mundschleimhaut-Äquivalents sollte die Gefäßausbildung durch Endothelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent zur Prävasikularisierung und die Ausbildung und Differenzierung eines funktionalen, mehrschichtigen Epithels betrachtet werden. Zur Analyse der interzellulären Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents sollte die Sekretion verschiedener Zytokine über die Kultivierungszeit hinweg untersucht werden. Um eine Prävasikularisierung bis in tiefe Bereiche des Mundschleimhaut-Äquivalents zu erreichen, sollten die Endothelzellen mittels chemotaktischer Reize dazu angeregt werden in die Kollagenmatrix hinein zu migrieren. Hierfür wurde versucht chemotaktische Gradienten in Transwell- und Gel-

Systemen zu erzeugen. Des Weiteren wurde versucht mit Hilfe von Nanopartikeltechnologie eine Methode zur Prävaskularisierung zu etablieren bei der eine kontrollierbare und längerfristige Freisetzung von eingekapselten angiogenen Wachstumsfaktoren erzeugt werden kann. Die Injektion von Endothelzellen in das Mundschleimhaut-Äquivalent hinein stellte eine weitere Optimierungsmethode der Prävaskularisierung dar. Zur Stimulation der Ausbildung des Epithels sollte das Mundschleimhaut-Äquivalent *in vitro* mit extrakorporalen Stoßwellen behandelt und die Auswirkung auf die Entwicklung und Differenzierung des Epithels und die Basalmembran, auf die metabolische Aktivität der *in vitro*-Kultur sowie auf die Gefäßausbildung analysiert werden (Abbildung 5). Die potenzielle Gewebeintegration sollte mit Hilfe des Chorioallantoismembran-Assays *in ovo* untersucht werden. Diese Arbeit soll die Herstellung einer personalisierten Alternative für autologe Schleimhautgewebe in der rekonstruktiven Chirurgie der klinischen Anwendung näherbringen.



**Abbildung 5: Skizzierte Übersicht der Methodenfelder zum Erreichen der Zielsetzung.**

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
alamarBlue™ Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ampuwa Sterilwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe
bFGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Borsäure, ≥99,5 %, Ph. Eur., USP, BP	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CnT-Prime Epithelial Proliferation Medium	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Collagen Type I solution, bovine	Viscofan BioEngineering, Weinheim
Collagen I, human	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Corning® Matrigel®	Corning, Corning, New York, USA
Dako REAL™ Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Defined Trypsin Inhibitor	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dispase II (von Bacillus polymyxa)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DMEM/F-12 (1:1) (1X)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - hoher Glucoseanteil	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco, Kalifornien, USA
EBM™-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Lonza Group, Basel, Schweiz
EDTA-Na <sub>2</sub>	Boehringer Mannheim, Mannheim
EGM™-2 Endothelial SingleQuots™ Kit	Lonza Group, Basel, Schweiz
Endothelial Cell Growth Media MV	PromoCell, Heidelberg
Epidermal growth factor	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Ethanol 96 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99,8 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gelatine from bovine skin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatologie Puffertabletten nach Weise pH 6,8	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 2	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 3	Merck, Darmstadt
HEPES solution, 1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HES-Nanopartikel mit Sulforhodamin-101 (KK100zg/KK100zk/KK100zl)	Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, Mainz
HES-Nanopartikel mit VEGF 121 (KK170/KK170a/KK182)	Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, Mainz
Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel	Hico, Köln
Hydrocorticon	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Insulin solution human	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ CLSII	Biochrom GmbH, Berlin
Medium 199 10X	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rh VEGF-121 #11344688	Immuno Tools, Friesoythe
ROTI®Histofix 4 %	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS - Lösung 20 % reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Stärke-Nanopartikel mit Sulforhodamin-101(KK171/KK176/KK176a)	Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, Mainz
Stärke-Nanopartikel mit VEGF 121(KK172/KK177/KK183)	Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, Mainz
Target Retrieval Solution, pH 9 (10X)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Terg-a-zyme	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Thiazolylblau-tetrazoliumbromid #M2128	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIS, PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA, 0,25 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Versene EDTA, 0,02 %	Lonza, Basel, Schweiz,

Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Xylene, mixture of isomers	AppliChem, Darmstadt
$\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas #A4268	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer samt ihrer jeweiligen Zusammensetzung

Lösung und Puffer	Zusammensetzung
0,2 M HCL	1 M HCL in Aqua dest.
70 % Ethanol	99,8 % Ethanol-Verdünnung mit vollentsalztem Wasser
1 % Agarose-Gel	1 % Agarose in 1x TBE
BSA-Lösung	0,1 % oder 1 % BSA in DPBS
Dispase II-Lösung	24 U/ml in DPBS
Gelatine-Lösung	2 mg/ml Gelatine in DPBS
Kollagen I-Lösung	50 $\mu$ g/ml Kollagen I in DPBS
Kollagenase II-Lösung	1 g Kollagenase II in Kollagenase II Puffer
Kollagenase II-Puffer	3,9 g NaCl 0,5 g KCl 2,4 g HEPES (1M) 0,7 g CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O pH 7,2 einstellen und auf 1 l mit vollentsalztem Wasser auffüllen
Phosphatgepufferte Salzlösung	0,2 g KCl 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> wasserfrei 8 g NaCl 0,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei pH 7,4 einstellen und auf 1 l mit vollentsalztem Wasser auffüllen
Solubilisierungspuffer	0,01 N HCl in 10 % SDS
TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	11 g Tris 6 g Borsäure 1 g EDTA-Na <sub>2</sub> in 1 l vollentsalztem Wasser
TRIS-Puffer	1,2114 g TRIS in 450 ml Aqua dest. pH 7,0 einstellen und auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen

## 2.1.3 Zusätze der Zellkulturmedien

Tabelle 3: Verwendete Zusätze der Zellkulturmedien und ihre jeweilige Zusammensetzung

Medienzusatz	Zusammensetzung
Adenin	1,215 g Adenin in 50 ml 0,2 M HCl
bFGF	25 $\mu$ g/ml bFGF in TRIS-Puffer mit DPBS auf 1,25 $\mu$ g/ml verdünnen
Choleratoxin	0,5 mg Choleratoxin in 595 $\mu$ l H <sub>2</sub> O



EGF	200 µg EGF in 20 ml H <sub>2</sub> O
Hydrocortison	1 mg Hydrocortison in 200 µl 99,8 % Ethanol und 2,3 ml H <sub>2</sub> O
Insulin (10,8 mg/ml)	gebrauchsfertig erworben
Natrium-Heparin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O

#### 2.1.4 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien mit der jeweiligen Zusammensetzung

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
ECFC-Medium	500 ml EBM™-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 + EGM-2 Single Quots + 20 % FCS
Epithelzell-Medium	500 ml CnT-Prime + 1 % P/S
FAD <sub>complete</sub> -Medium:	60 % DMEM + 30 % DMEM/F-12 (1:1) + 10 % FCS + 1 % P/S + 22 µg/ml Adenin + 7,4 µg/ml Cholera toxin + 9 ng/ml EGF + 36 ng/ml Hydrocortison + 5,412 µg/ml Insulin
Fibroblasten-Medium	500 ml DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S
HDMEC-Medium	500 ml Endothelial Cell Growth Media MV + 15 % FCS + 1 % P/S + 2,5 ng/ml bFGF + 10 µg/ml Natrium-Heparin + 28 mM HEPES
Serumfreies FAD <sub>complete</sub> -Medium	60 % DMEM + 30 % DMEM/HAM's-F12 (1:1) + 1 % P/S
Serumfreies HDMEC-Medium	500 ml Endothelial Cell Growth Media MV + 1 % P/S + 28 mM HEPES

## 2.1.5 ELISA-Kits

**Tabelle 5: Verwendete ELISA-Kits mit Herstellerangaben**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 # DY008	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Human Angiopoietin-2 Quantikine ELISA Kit # DANG20	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Human Cytokine ELISA Plate Array I # EA-4001	Signosis, Santa Clara, Kalifornien, USA
Human eNOS DuoSet ELISA # DY950-05	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Human FGF basic/FGF2/bFGF DuoSet ELISA # DY233	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA # DY208	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Human VEGF DuoSet ELISA #DY293B	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

## 2.1.6 Microbeads

**Tabelle 6: Verwendete Microbeads mit Herstellerangaben**

<b>Microbeads</b>	<b>Hersteller</b>
Dynabeads™ CD31 Endothelial Cell # 11155D	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

## 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper samt Informationen zur Spezies und Anwendung, sowie Herstellerangaben.** Die Antikörper fanden ihre Anwendung in einer Immunfluoreszenz-Färbung (IF) oder einer Immunhistochemischen Färbung (IHC).

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Anwendung</b>
Alexa Fluor® 594 anti-human CD14 Antibody, # 325630, Clone HCD14, Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IF (1:800)
Alexa Fluor® 647 anti-human CD31 Antibody, # 303111, Clone WM59, Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IF (1:4000)
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody, # 400130, Clone MOPC-21, Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IF (1:800)
Anti-Collagen IV antibody, Clone COL-94, #ab6311, Abcam, Cambridge, UK	Mouse monoclonal	IHC (1:250)

Anti-Occludin antibody, #ab1689986, Abcam, Cambridge, UK	Rabbit polyclonal	IHC (1:300)
CD31, Endothelial Cell (Concentrate), #M0823, Clone JC70A, Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IF, IHC (1:50)
Cytokeratin 19 (Concentrate), Clone RCK108, #M0888, Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IHC (1:100)
F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488, # A-11007, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Goat polyclonal	IF (1:200)
Human CD133 Alexa Fluor® 488-conjugated Antibody, # FAB11331G, Clone 170411, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	Mouse monoclonal	IF (1:8000)
Involucrin Monoclonal Antibody, Clone SY5, # MA5-11803, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Mouse monoclonal	IHC (1:200)
Monoclonal Anti-Laminin antibody produced in mouse, Clone LAM-89, #L8271, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Mouse monoclonal	IHC (1:1000)
Monoclonal Anti-Tenascin antibody produced in mouse, # T2551, Clone BC-24, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Mouse monoclonal	IHC (1:5000)
Mouse IgG2a Isotype Control, FITC, # PA5-33239, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Mouse monoclonal	IF (1:8000)
Recombinant Anti-Cytokeratin 13 antibody, Clone EPR3671, # ab92551, Abcam, Cambridge, UK	Rabbit monoclonal	IHC (1:500)
Von Willebrand Factor (Concentrate) #M0616, Clone F8/86, Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA	Mouse monoclonal	IHC (1:1000)

## 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
1.000 µl graduiert TipOne® Pipettenspitze	StarLab, Hamburg
200 µl UltraPoint® graduiert TipOne® Pipettenspitze	StarLab, Hamburg
BD Microlance™ 3 Sonderkanülen (30G 1/2)	BD, Heidelberg
Befruchtete Leghorn Hühnereier	LSL Rhein-Main GmbH, Dieburg
Biopsy Punch (6 mm)	Stiefel Laboratorium, Durham, North Carolina, USA

CELLSTAR® Cell Culture Flasks (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Cell Culture Plate (6, 12, 24, 48, 96 Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Cellreactor Röhrrchen/ Zellkulturröhrrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Corning® CellBIND® Multiwellplatte, size 6 wells	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Deckgläschen 24 x 50 mm	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Disposable Glass Pasteur Pipettes (230 mm)	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Durchsichter Nagellack	P2 cosmetics, Wien, Österreich
EASYSTRAINER 100 µM	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Einmalskalpelle (No. 23)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., OSAKA, Japan
Einmalspritze Omnifix® mit Luer-Lock-Anschluss, 10 ml, 100 Stück	Carl Roth, Karlsruhe
Filter für AP48, A3BP48, AA12 und AA10	Neuro Probe Inc, Gaithersburg, Maryland, USA
Filtropur V50, Vakuumfiltrationseinheit, 500 ml, PES, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Geistlich Bio-Gide®	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
Greiner CELLSTAR® dish (100 mm x 20 mm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kryoröhrrchen Cryogenic Tubes Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
LeucoSEP™ Röhrrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Leukosilk®	BSN medical GmbH, Hamburg
LUNA™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Gyeonggi-do, Südkorea
Objektträger	DAKO, Santa Clara, Kalifornien, USA
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Omnifix®-F Luer Solo 0.01 ml – 1 ml	B.Braun, Melsungen
Parafilm	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pasteurpipetten Kunststoff (3 ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipette Tip, 0.1-20µl	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly® 21G 200 mm lang	Sarstedt, Nümbrecht
schülke wipes safe&easy	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Sempercare® nitrile Einmalhandschuhe	Semperit, Wien, Österreich
Serologische Pipetten ( 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
S-Monovette® 9ml K3E	Sarstedt, Nümbrecht

Sterican® Gr. 2, G 21 x 1 1/2" / ø 0,80 x 40 mm	B. Braun Melsungen
TC-Inserts, 24 Well, PET 0.4 µm, TP	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue-Tek II Filterblock für Einbettkassetten	Vogel, Gießen
Tissue-Tek® Mesh Biopsiekassetten	Science Services, München

## 2.1.9 Gebrauchsmaterialien

**Tabelle 9: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangaben**

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Boyden-Kammer 48-Well Micro Chemotaxis Chamber	Neuro Probe Inc, Gaithersburg, Maryland, USA
Chirurgische Instrumente	Aesculap, Braun, Tuttlingen
CoolCell® LX	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fettstift	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Küchenschaber	WMF, Geislingen an der Steige
Objektträgergestell für Immunhistochemie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Pistill	Carl Roth, Karlsruhe
Replacement Gaskets	Neuro Probe Inc, Gaithersburg, Maryland, USA
Rotilabo®-micro-Magnetrührstäbchen (8 mm)	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.1.10 Geräte

**Tabelle 10: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Brand accu-jet® pro-Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Brutmaschine Modell 400 digital	Bruja, Hammelburg
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus
Desktop PC-Systeme	Fujitsu, Minato, Präfektur Tokio, Japan
Digitales Mikroskop VHX-1000D	Keyence, Ōsaka, Japan
Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Eppendorf Research® plus (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg
Feuchtkammer	Selbthergestellt
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	Vacuubrand, Wertheim
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank (-80 °C)	Nalge Nunc Int, Waltham, Massachusetts, USA

GloMax®-Multi+ Detection System with Instinct® Software	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Grant analoge Ultraschallbäder XUBA Serie	Grant instruments, Shepreth, UK
Heracell™ VIOS 160i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Inverses Labormikroskop Leica DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar
Kendro UVC 30	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Kryobehälter	Air Liquide, Paris, Frankreich
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Luna™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Gyeonggi-do, Südkorea
Magnetic Separation Rack (15 ml)	OZ BIOSCIENCES, Marseille, Frankreich
Megafuge 1.0R Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Schlittenmikrotom SM200R	Leica Microsystems, Wetzlar
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Swiss DolorClast® Classic	EMS, Nyon, Schweiz
Systec Tischaufoklav DX65	Systec GmbH, Linden
TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar
Thermo Scientific™ Locator™ 6 Plus Gestell- und Boxensysteme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermoschüttler pro	Cellmedia, Zeitz
Tissue Drying Oven TDO 60	MEDITE Medical, Burgdorf
Tissue-Tek Thermal-, Dispensing- und Kryo-Konsole	Miles Scientific, Newark, New Jersey, USA
Tissue-Tek VIP Einbettautomat	Miles Scientific, Newark, New Jersey, USA
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zeiss Axioskop 2 mit Rasterokular (444232-9904)	Zeiss, Oberkochen

## 2.1.11 Software

Tabelle 11: Verwendete Software mit Herstellerangaben

Software	Hersteller
Fiji (Fiji Is Just ImageJ)	Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Albert Cardona, Mark Longair, Benjamin Schmid et al.
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

## 2.1.12 Primärzellen & Isolationsgewebe

Tabelle 12: Verwendete Primärzellen mit den jeweiligen Isolationsgeweben

Primärzellen	Isolationsgewebe
Endotheliale kolonieformende Vorläuferzellen ( <i>endothelial colony forming cells</i> ; ECFC)	Humanes Vollblut
Epithelzellen	Humane Mundschleimhaut
Fibroblasten	Humane Mundschleimhaut
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen ( <i>human dermal microvascular endothelial cells</i> ; HDMEC)	Humane juvenile Vorhaut

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Steriles Arbeiten

Die Arbeiten mit lebenden Zellen fanden unter sterilen Bedingungen innerhalb der Sicherheitswerkbank statt. Die verwendeten Materialien waren vor dem Gebrauch steril abgepackt und wurden nur innerhalb der Sicherheitswerkbank geöffnet. Unsterile Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien wurden autoklaviert und mittels UV-Licht sterilisiert. Die Zellkulturmedien, sowie bestimmte Lösungen und Puffer wurden vor ihrem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und vor der Überführung unter die Sicherheitswerkbank mit 70 % Ethanol-getränkten Tüchern von außen desinfiziert. Bei allen Arbeiten wurden Einmalhandschuhe getragen.

### 2.2.2. Gelatine-Beschichtung von Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien, wie Zellkulturflaschen und Well-Platten, die mit Endothelzellen besiedelt wurden, wurden zuvor mit Gelatine beschichtet. Dabei wurde eine Gelatine-Lösung (2 mg/ml) auf das jeweilige Verbrauchsmaterial gegeben, so dass die gesamte Fläche, welche mit Endothelzellen besiedelt werden sollte, bedeckt war. Das verwendete Volumen der Gelatine-Lösung variierte je nach benötigtem Verbrauchsmaterial (Tabelle 13). Das mit Gelatine bedeckte Material wurde über Nacht in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 38 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gestellt. Danach wurde die überschüssige Gelatine abgenommen und die beschichtete Oberfläche mit DPBS gespült. Bis zur Verwendung wurde die beschichtete Oberfläche des Verbrauchsmaterials mit DBPS bedeckt und das Material im CO<sub>2</sub>-Inkubator gelagert.

**Tabelle 13: Unterschiedliche Verbrauchsmaterialien, die vor ihrer Besiedlung mit Endothelzellen mit verschiedenen Volumen einer Gelatine-Lösung (2 mg/ml) beschichtet wurden.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Volumen der Gelatine-Lösung zur Beschichtung</b>
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	5 ml
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	10 ml
175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	15 ml
96-Well-Platte	100 µl

### 2.2.3 Primärzell-Isolation

Die Primärzellen wurden anonym ohne die Aufzeichnung patientenbezogener Daten und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki isoliert und verwendet. Dies wurde von der örtlichen Ethikkommission (Landesärztekammer Rheinland-Pfalz, Nr. 2021-15794\_1) genehmigt. Von jeder Patientin und jedem Patienten wurde eine informierte Zustimmung eingeholt.

#### 2.2.3.1 Isolation von Fibroblasten und Epithelzellen aus humaner Mundschleimhaut

Bei der verwendeten Mundschleimhaut handelte es sich um gesundes Gewebe, welches als Überschussmaterial bei Operationen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie anfiel. Die Mundschleimhaut-Probe wurde zunächst zwei Mal für 15-20 sec in 70 % Ethanol desinfiziert und daraufhin einmal in *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gespült. Danach wurde das Gewebe in DPBS in eine Petrischale überführt.



Mithilfe eines Skalpells und einer Pinzette wurde das Epithel vom Bindegewebe der Mundschleimhaut getrennt und beide Anteile in etwa 1 mm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten. Die einzelnen Gewebestücke wurden in die Wells einer *Corning® CellBIND® 6-Well*-Platte mit der Schnittfläche nach unten überführt. Dabei wurden jeweils sechs Epithelstücke oder Bindegewebsstücke in ein Well gelegt. Die Gewebestücke wurden für 10 min an die Platte antrocknen gelassen. Danach wurden vorsichtig 1,5 ml FAD<sub>complete</sub>-Medium je Well zu den Gewebestücken gegeben. Die Platten wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 38 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, bis die ersten Zellen aus den Gewebestücken auswuchsen. Ab diesem Tag wurde das FAD<sub>complete</sub>-Medium auf das jeweilige zelltypspezifische Zellkulturmedium umgestellt.

Für die Isolation der Epithelzellen wurde das FAD<sub>complete</sub>-Medium auf Epithelzell-Medium umgestellt. Bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 90 %, wurde das Gewebestück vorsichtig aus dem Well entfernt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen im Well mit DPBS gespült. Danach wurden sie mit 0,5 ml/Well Trypsin-EDTA (0,25 %) gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 1 ml Trypsin-Inhibitor und 1 ml Epithelzell-Medium in ein Zellkulturröhrchen aufgenommen und bei 300 x g, Raumtemperatur (RT) und für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Epithelzell-Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Flaschen wurden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator überführt und dort bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage.

Für die Isolation der Fibroblasten wurde das FAD<sub>complete</sub>-Medium auf Fibroblasten-Medium umgestellt. Sobald eine Zellkonfluenz von etwa 90 % in einem Well erreicht war, wurde das Gewebestück vorsichtig aus dem Well entfernt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen im Well mit DPBS gespült. Danach wurden sie mit 0,5 ml/Well Trypsin-EDTA (0,25 %) gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 2 ml Fibroblasten-Medium in ein Zellkulturröhrchen aufgenommen und bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Zellkulturflaschen wurden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator überführt und dort bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage.

### 2.2.3.2 Isolation von Endothelzellen aus der juvenilen Vorhaut

Die Gewebeprobe fiel bei Zirkumzisionen in der Urologie an. Die Probe wurde zweimal mit 70 % Ethanol für 15-20 Sekunden desinfiziert und danach einmal mit DPBS gespült. Danach wurde das Gewebe in DPBS in eine Petrischale überführt. Mithilfe der Pinzette und einer kleinen Schere wurde das Bindegewebe abgetrennt. Danach wurde das Gewebe mithilfe eines Skalpell in etwa 6 mm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in ein Zellkulturröhrchen überführt, welches 10 ml Dispase II-Lösung (2,4 U/ml in DPBS) beinhaltet. Dies inkubierte für mindestens 16 h und maximal 24 h bei 4 °C auf einem Schüttler. Die Dispase löste dabei die äußerste Epithelschicht des Gewebes ab. Danach wurden die Gewebestücke in eine Petrischale überführt und dreimal mit DPBS gespült, um die Enzymlösung zu entfernen. Danach wurden die Gewebestücke in der Petrischale mit DPBS bedeckt. Mithilfe eines Skalpell wurde die Epithelschicht vorsichtig abgekratzt. Die Stücke wurden in eine Kollagenase II-Lösung (1 mg/ml) überführt. Dies inkubierte bei im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C für 1 h. Danach wurde die Enzymreaktion mit 20 ml FCS abgestoppt. Die Gewebestücke wurden samt der FCS/Kollagenase II-Lösung in eine Petrischale überführt und für 10 min mit einem Pistill zerstoßen. Die FCS/Kollagenase II-Lösung wurde mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt und durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) gegeben. Die filtrierte Lösung wurde bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in HDMEC-Medium resuspendiert und in einem Volumen von 5 ml in eine Gelatine-beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Zellkulturflasche wurde in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt und dort bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei der Isolation der HDMEC war die ungewollte Kontamination mit Fibroblasten nicht zu vermeiden. Sobald die ersten größeren Cluster an Endothelzellen unter dem Mikroskop zu erkennen waren und die Fibroblasten die Kultur noch nicht überwachsen hatten, wurde eine Trennung der beiden Zelltypen mithilfe von CD31-Antikörpergekoppelten magnetischen Dynabeads™ durchgeführt. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Flasche mit 10 ml DPBS gespült. Damit wurde restliches Medium entfernt, da dieses die folgende Trypsin-Reaktion hemmt. Das DPBS wurde abgenommen und 1 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) auf die Zellen gegeben. Die Flasche wurde für 3 min in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt, bis sich die Zellen gelöst

hatten. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden 8 ml HDMEC-Medium hinzugegeben. Die gesamte Flüssigkeit wurde in ein Zellkulturröhrchen übertragen und bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml einer 0,1 % Bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung in DPBS resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 10 µl der magnetischen CD31-Dynabeads™ hinzu pipettiert. Dies inkubierte für 15 min bei 4 °C auf dem Schüttler, so dass die Antikörper-gekoppelten Magnetbeads spezifisch an CD31 auf der Oberfläche von Endothelzellen binden konnten. Danach wurde die gesamte Lösung für 3 min in ein Magnetrack gestellt. Die magnetischen *Beads*, an denen die Endothelzellen gebunden waren, sammelten sich in dem Zellkulturröhrchen an der Wand, die zum Magnetrack gerichtet war. Vorsichtig wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen und verworfen. Danach wurde das Zellkulturröhrchen mit den *Beads* wieder aus dem Magnetrack genommen und 10 ml DPBS hinzu pipettiert. Das Zellkulturröhrchen wurde zurück in das Magnetrack gestellt und der vorherige Schritt wurde weitere zwei Mal für 3 min wiederholt. Danach wurde 5 ml HDMEC-Medium zu den mit *Beads*-gebundenen Endothelzellen pipettiert und diese in eine Gelatine-beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Zellkulturflasche wurde in den CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gestellt. Alle 2-3 Tage folgte ein Mediumwechsel. Sobald die Kulturflasche dicht mit Endothelzellen besiedelt war, konnten sie in eine Gelatine-beschichtete 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt werden.

### 2.2.3.3 Isolation von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Vollblut

Zur Isolation von endothelialen Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPC) aus dem peripheren Blut wurden zunächst zwei 6-Well-Platten mit 1,5 ml Kollagen I-Lösung (50 µg/ml) pro Well bei 37 °C über Nacht beschichtet.

Durch eine periphere Venenpunktion wurden freiwilligen Spender\*innen ca. 35 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Das Blut einer Person wurde in ein Zellkulturröhrchen überführt und vereint. In ein LeucosSEP™-Röhrchen wurden 15 ml *Biocoll Separating Solution* vorgelegt. Dieses wurde daraufhin kurz zentrifugiert, damit sich die Lösung unter dem Filter innerhalb des Röhrchens sammelt. Danach wurden jeweils 25 ml Blut vorsichtig auf den Filter pipettiert. Das Blut lagerte sich auf dem Filter auf. Daraufhin folgte eine Zentrifugation bei 754 x g ohne Bremse bei RT für 30 min.

Die *Biocoll Separating Solution* besitzt eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, jedoch eine geringere Dichte als zum Beispiel Erythrozyten oder tote Zellen (Boyum 1964). Durch die Dichtegradientenzentrifugation lagerten sich die EPC in der Interphase zwischen Serum und *Biocoll Separating Solution* ab. Die Interphase wurde mittels Pasteurpipetten vollständig abgenommen und in ein Zellkulturrohrchen überführt, ohne andere Phasen mit aufzunehmen. Diese wurde daraufhin mit DPBS 1:1 verdünnt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 535 x g mit Bremse für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war. Das Zellpellet wurde in 48 ml ECFC-Medium resuspendiert. Von den vorbereiteten Kollagen I-beschichteten 6-Well-Platten wurde die überschüssige Beschichtungslösung abgesaugt. Jeweils 4 ml der resuspendierten Zellen wurden in ein Well pipettiert. Die Platten wurden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator überführt und dort bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Innerhalb der ersten sieben Tage fand täglich ein Mediumwechsel statt. Vor der Zugabe des frischen Mediums wurden die Zellen mit DPBS + 3 % FCS gewaschen. Nach den ersten sieben Tagen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nachdem die ersten Kolonien von endothelialen kolonieformenden Vorläuferzellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC) sichtbar waren, wurden die Zellen auf HDMEC-Medium umgestellt. Sobald die Zellen mindestens die Hälfte eines Wells bedeckten, wurden sie mit 2 ml DPBS gewaschen und mit 0,5 ml Versene abgelöst. Danach wurden die Zellen eines Wells in eine Gelatine-beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche umgesiedelt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

## 2.2.4 Zellkultur

### 2.2.4.1 Kultivierung der Primärzellen

Die Primärzellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Kultivierung der HDMEC und ECFC wurden die Flaschen am Vortag mit 2 mg/ml Gelatine beschichtet. Die Flaschen standen zur Kultivierung in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Medienwechsel fanden alle zwei bis drei Tage statt. Um das Medium zu wechseln, wurde das verbrauchte

Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml DPBS gespült und neues Medium in die Zellkulturflaschen gegeben.

Ab einer Konfluenz der Zellen von etwa 90 % wurden die Zellen abgelöst und passagiert. Zum Ablösen der adhärennten Zellen aus den Zellkulturflaschen wurde das Medium restlos aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen einmalig mit 10 ml DPBS gespült. Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen wurden mit Trypsin-EDTA (0,25 %) und ECFC mit Versene aus den Zellkulturflaschen gelöst. Je nach Größe der Zellkulturflasche wurden 0,5 ml, 1 ml oder 2 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) auf die Zellen gegeben. Um die Zellen zu lösen, wurden die Flaschen für 3 min mit dem Enzym im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob sich alle Zellen gelöst hatten. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der doppelten Menge des jeweiligen serumhaltigen Zellkulturmediums abgestoppt. Für das Abstoppen der Trypsin-Reaktion bei den Epithelzellen wurde aufgrund des serumfreien Epithelzell-Mediums (CnT-Prime) ein gebrauchsfertiger Trypsin-Inhibitor verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein Zellkulturröhrchen überführt und bei 300 x g, RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und je nach Zelldichte und bevorstehenden Versuchen gesplittet. Die nicht benötigte Zellsuspension wurde je nach Zellpassage verworfen oder eingefroren.

Zum Zählen der Zellen wurden die abgelösten Zellen gründlich durch Auf- und Abpipettieren in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension in einen LUNA™ Cell Counting Slide pipettiert. Das Slide wurde in den LUNA™ Automated Cell Counter eingeführt. Dieser berechnete die Zellzahl je Milliliter.

HDMEC, ECFC und Epithelzellen wurden bis einschließlich Passage 5 und Fibroblasten bis einschließlich Passage 12 verwendet, sofern sie keine morphologischen Auffälligkeiten aufwiesen.

#### 2.2.4.2 Kryokonservierung und Re-Kultivierung der Primärzellen

Für die Kryokonservierung von Primärzellen wurde die Zellsuspension, welche eingefroren werden sollten, bei 300 x g, bei RT für 5 min zentrifugiert. Das Einfriermedium wurde aus FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Das Zellpellet wurde in dem Einfriermedium resuspendiert und je 1,5 ml in Kryoröhrchen überführt. Bei vollständiger Konfluenz der Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche

konnten zwei Kryoröhrchen befüllt werden. Diese wurden in einen CoolCell®-Behälter gesteckt, dessen innerer Metallring RT besitzen musste. Dies sorgte dafür, dass die Zellen pro Minute etwa 1 °C herunterkühlten. Die Box wurde zunächst bei -80 °C gelagert. Nach 24 h konnten die Röhrchen in die mit Flüssigstickstoff gefüllten Kryobehälter überführt werden.

Für die Re-Kultivierung wurden die kryokonservierten Zellen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C für maximal 2 min aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurden mit 2 ml des jeweiligen Zellkultur-Mediums in ein Zellkulturröhrchen überführt. Dies wurde bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 ml des jeweiligen Zellkultur-Mediums resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Diese wurden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator überführt und dort bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.2.5 Zellbesiedlung der Kollagenmatrix

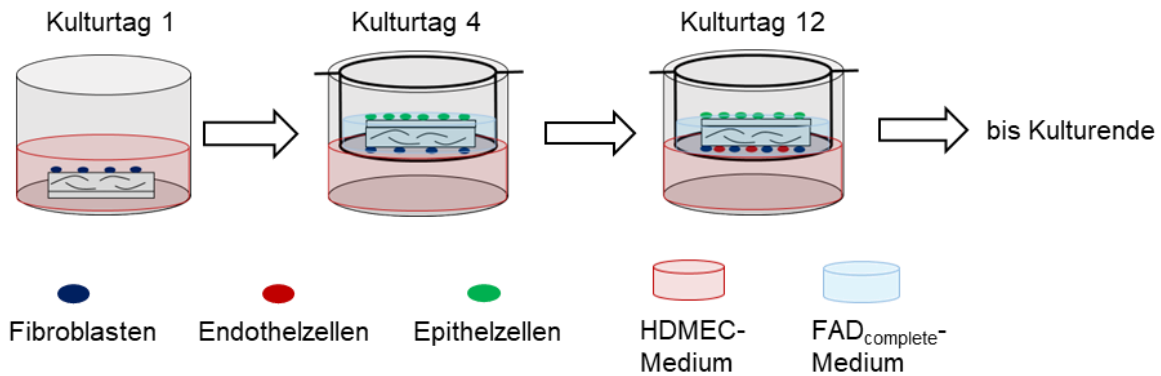
Die Kollagenmatrix (Bio-Gide® der Firma Geistlich) wurde mittels Hautstanze in runde Stücke mit einem Durchmesser von 6 mm ausgestanzt. Die Kollagenmatrix besitzt eine poröse Seite und eine glatte, zellokklusive Seite, die sich im trocknen Zustand sehr gut unterscheiden lassen. Um die Orientierung im feuchten Zustand beizubehalten, wurden die Kollagenmatrices mittels eines Einschnittes markiert.

Die Zellbesiedlung der Kollagenmatrix erfolgte immer nach dem gleichen Schema. Die Besiedlung mit Fibroblasten erfolgte an Kulturtag 1, die Besiedlung mit Epithelzellen an Kulturtag 4 und die Besiedlung mit Endothelzellen an Kulturtag 12 (Tabelle 14). Dabei war es egal ob, die Kollagenmatrix mit einer Mono- einer Bi- oder einer Tri-Kultur an Zellen besiedelt wurde. Um verschiedene Kulturen untereinander zu vergleichen, wurden immer die gleichen Medienbedingungen geschaffen egal ob es sich um eine Mono-, Bi- oder Tri-Kultur handelte. Die Kultur wurde je nach Fragestellung des Versuchs an unterschiedlichen Kulturtagen beendet.

Tabelle 14: Reihenfolge und Zellkonzentration der Besiedlung der Kollagenmatrix.

	<b>Fibroblasten</b>	<b>Epithelzellen</b>	<b>HDMEC</b>	<b>ECFC</b>
<b>Kulturtag der Zellaussaat</b>	1	4	12	12
<b>Kulturmedium</b>	HDMEC-Medium	FAD <sub>complete</sub> -Medium	HDMEC-Medium	HDMEC-Medium
<b>Zellen/Kollagenmatrix</b>	$5,6 \times 10^4$	$1,12 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$

Die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents wird mit der Herstellung einer Tri-Kultur wie folgt beschrieben. Einen Tag vor der Zellaussaat der Fibroblasten wurden diese auf HDMEC-Medium umgestellt. An Kulturtag 1 wurde die Matrix für 20 min mit serumfreiem HDMEC-Medium hydriert. Ebenfalls an Kulturtag 1 wurden 24 h nach der Medienumstellung die Fibroblasten in 200 µl HDMEC-Medium auf die poröse Seite der Matrix, die sich in einer 96-Well-Platte befand, ausgesät. An Kulturtag 2, nach weiteren 24 h, wurde die Kollagenmatrix mit der porösen Seite nach oben gerichtet, in ein neues Well der 96-Well-Platte überführt und mit 200 µl HDMEC-Medium bedeckt. 24 h vor der Aussaat der Epithelzellen wurden diese auf FAD<sub>complete</sub>-Medium umgestellt. An Kulturtag 4 wurde die Kollagenmatrix mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben gerichtet in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Dort wurden die Epithelzellen in 200 µl FAD<sub>complete</sub>-Medium auf die Kollagenmatrix ausgesät. Nach 4 h wurde die Kollagenmatrix mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben gerichtet in ein Transwell-System überführt. In das Well wurden 250 µl HDMEC-Medium gegeben und auf die Kollagenmatrix in dem Insert wurden 50 µl FAD<sub>complete</sub>-Medium geträufelt. An Kulturtag 12 wurde die Kollagenmatrix mit der porösen Seite nach oben gerichtet erneut auf eine 96-Well-Platte überführt. Dort wurden Endothelzellen in 200 µl HDMEC-Medium auf der porösen Seite der Matrix ausgesät. Nach 4 h wurde die Kollagenmatrix mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben gerichtet zurück in das Transwell-System überführt. In das Well wurden 250 µl HDMEC-Medium gegeben und auf die Kollagenmatrix in dem Insert wurden 50 µl FAD<sub>complete</sub>-Medium geträufelt, so dass die Epithelzellen an der Luftgrenze waren (Abbildung 6). Dies kultivierte die komplette Kulturzeit im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Alle zwei bis drei Tage, ab Kulturtag 1 gerechnet, fand ein Medienwechsel statt.



**Abbildung 6: Schematische Abbildung der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents (Tri-Kultur).** Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen wurden an verschiedenen Kulturtagen auf der Kollagenmatrix ausgesät. Die Kultivierung wurde mithilfe eines Transwell-Systems mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien durchgeführt.

Wurden Mono- oder Bi-Kulturen auf der Kollagenmatrix hergestellt, wurden die beschriebenen Kulturtage wie bei der Tri-Kultur eingehalten und die nicht benötigten Zelltypen weggelassen.

Am Kulturende wurde die Kollagenmatrix mit 1 ml DPBS gewaschen und in 4 % ROTI®Histofix bei 4 °C für 1 h fixiert. Danach wurde die Kollagenmatrix bis zu einer Färbung in DPBS bei 4 °C gelagert.

### 2.2.6 Generierung und Analyse von Zellkulturüberständen

Die besiedelten Kollagenmatrices inkubierten wie beschrieben im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Alle zwei bis drei Tage fand ein Medienwechsel statt. Dabei erhielten die Fibroblasten und Endothelzellen vom Well aus HDMEC-Medium und die Epithelzellen vom Insert aus FAD<sub>complete</sub>-Medium. Für die Entnahme der Überstände wurden beide Kulturmedien 24 h vor der jeweiligen Überstandsentsnahme aus dem Well und im Insert von der Kollagenmatrix entfernt. Beide Bereiche des Transwell-Systems wurden mit DPBS gespült. Danach wurde serumfreies HDMEC-Medium in das Well und serumfreies FAD<sub>complete</sub>-Medium auf die Kollagenmatrix in das Insert gegeben. Die Überstände aus dem Well und dem Insert wurden nach 24 h restlos entnommen und vereint. Diese wurden bei -20 °C bis zum Zeitpunkt der Analyse eingefroren. Die Überstände wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und geben jeweils die Zellsekretion der letzten 24 h wieder.



Die gesammelten und bei -20 °C eingefrorenen Ansätze wurden mittels verschiedener Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) analysiert. Dabei wurde speziell die Sekretion von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), Interleukin-8 (IL-8), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Angiopoietin-2 analysiert. Zusätzlich wurde ein *Human Cytokine ELISA Plate Array I* durchgeführt, der die Sekretion von 32 verschiedenen Zytokinen untersucht. Dabei wurde die Sekretion von Adiponektin (Adipo), *Basic Nerve Growth Factor* (bNGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), Eotaxin, *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGFb), *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (GCSF), *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GMCSF), *Interferon Production Regulator* (IFNr), *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1), Interleukin (IL)-10, IL-12, IL-13, IL-17a, IL-1a, IL1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, *Interferon-Gamma Induced Protein 10* (IP-10), Leptin, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*(MCP-1), *Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha* (MIP-1a), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Placental Growth Factor* (PIGF), Rantes, Resistin, *Stem Cell Factor* (SCF), *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ , TNF $\alpha$  und VEGF untersucht.

Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerprotokollen der ELISA-Kits, mit dem Unterschied, dass die Überstands-Proben 1:1 verdünnt wurden und die Inkubation der Proben auf den ELISA-Platten anstatt 2 h bei RT über Nacht bei RT erfolgte. Die Auswertung der Platten erfolgte mithilfe des GloMax®-Multi+ Detection Systems.

## 2.2.7 Zellviabilitätsassays

### 2.2.7.1 MTT-Assay

Mithilfe des MTT-Assays ließ sich die Zellviabilität bestimmen. Der Assay beruht auf der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu Formazan (Buranaamnuay 2021). Er wird auf einer 96-Well-Platte durchgeführt, die bei der Verwendung von Endothelzellen vorher mit 2 mg/ml Gelatine über Nacht beschichtet werden musste. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Gelatine vor der Besiedlung mit Endothelzellen aus den Wells entfernt. Für die Verwendung von Fibroblasten und Epithelzellen wurden die Wells nicht beschichtet.

Je Well wurden  $3 \times 10^3$  Zellen in 100  $\mu$ l ihres jeweiligen Zellkulturmediums ausgesät. Die besiedelten Platten wurden für 24 h in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt, damit die Zellen

anwachsen konnten. Nach 24 h wurde das Zellmedium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Hinzu pipettiert wurden Stärke oder Hydroxyethylstärke (HES)-Nanopartikeln in SDS-Lösung oder  $\alpha$ -Amylase als jeweilige Behandlung der Zellen. Nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten wurden 10  $\mu$ l 0,5 % MTT in DPBS pro Well hinzugegeben. Dies inkubierte für 4 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Danach wurden je 100  $\mu$ l von frisch angesetztem Solubilisierungspuffer in die Wells gegeben. Dies inkubierte erneut für 4 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Danach erfolgte die Messung der Extinktion der Proben mithilfe des GloMax®-Multi+ Detection Systems bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 750 nm).

#### 2.2.7.2 AlamarBlue™-Assay

Mithilfe des alamarBlue™-Assays ließ sich ebenfalls die Zellviabilität bestimmen. Hierfür wurde das Zellkulturmedium von den jeweiligen Proben in einer 96-Well-Platte entfernt und 200  $\mu$ l einer 10 % alamarBlue™-Lösung in Zellkulturmedium auf die Proben gegeben. Dies inkubierte 4 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Danach wurden 100  $\mu$ l der alamarBlue™-Lösung entnommen und auf eine neue 96-Well-Platte überführt. Von diesen Proben wurde nun die Fluoreszenz bei 590 nm gemessen. Die Zellproben, deren Zellviabilität gemessen wurde, konnten mit DPBS gespült, in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium weiterkultiviert (im Gegensatz zu den Zellen im MTT-Assay) und zu einem beliebigen Zeitpunkt erneut mit alamarBlue™-Lösung versehen werden.

#### 2.2.8 Migrationsassay in der Boyden-Kammer

Die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen wurde mittels Migrationsassay in der Boyden-Kammer untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst für 24 h auf serumfreies HDMEC-Medium umgestellt. Für die Migrationsversuche mit Endothelzellen musste die benötigte Membran für die Boyden-Kammer mit Matrigel® beschichtet werden. Dafür wurde das Matrigel® 1:10 mit DPBS verdünnt und auf die Membran aufgetragen. Dies inkubierte bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Bei der verwendeten Membran handelte es sich um eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 8  $\mu$ m.

Am Tag des Migrationsassays wurden die Endothelzellen aus ihrer Zellkulturflasche gelöst und in serumfreiem HDMEC-Medium resuspendiert. In den unteren Teil der

Boyden-Kammer wurden je Well 29  $\mu\text{l}$  einer Lockstoff-Lösung pipettiert. In dieser Arbeit handelte es sich dabei um VEGF-121 oder aufgebrochenen Stärke- oder HES-Nanopartikeln in verschiedenen Konzentrationen. Die Lockstofflösungen wurde jeweils mit serumfreien HDMEC-Medium angesetzt. Serumfreies HDMEC-Medium ohne Lockstoff diente als Negativkontrolle. Die beschichtete Membran wurde für 3 min in DPBS und danach auf den unteren Teil der Boyden-Kammer gelegt. Auf die Membran wurde ein Dichtungsring gelegt und darauf wurde der obere Teil der Boyden-Kammer angebracht und alles mit Schrauben fixiert. In den oberen Kammerteil wurde 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $3 \times 10^4$  Endothelzellen) pro Well pipettiert. Alle Ansätze wurden in einem Vierfach-Ansatz aufgetragen. Die Boyden-Kammer wurde für 16 h in den  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit überführt.

Danach wurde der obere Teil der Kammer auf einem Papiertuch ausgeleert, die Schrauben gelöst und der obere Teil samt Dichtungsring entfernt. Die Zellen, die nicht migriert waren, wurden mit dem Puffer nach Weise abgewaschen. Die migrierten Zellen wurden für 1 min in -20 °C kaltem 99,8 % Ethanol fixiert und trocken gelassen. Danach folgte die Zellfärbung mittels *Rapid Staining Färbekit* der Firma Merck. Die Membran wurde drei Mal durch Hemacolor Solution 2 und sechs Mal durch Hemacolor Solution 3 gezogen. Die überschüssige Farbe wurde mit dem Puffer nach Weise entfernt. Danach wurde die Membran erneut trocken gelassen und auf einem Objektträger mit Immersionsöl aufgebracht. Ein Deckglas wurde mit durchsichtigem Nagellack darauf fixiert und trocken gelassen.

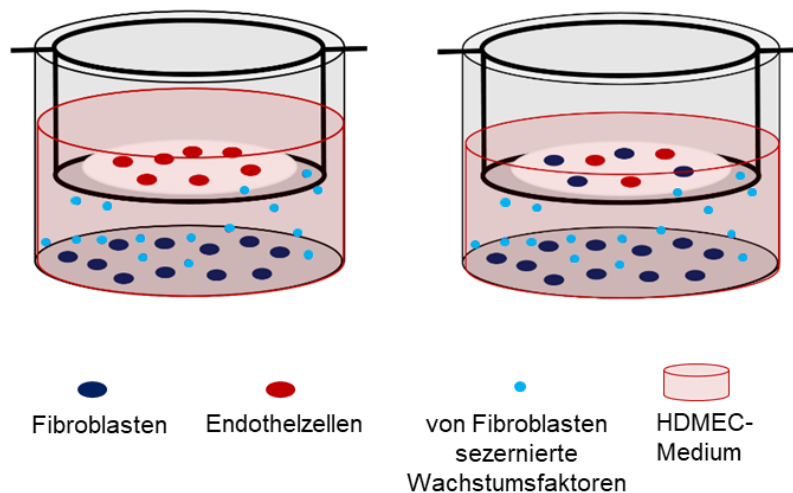
Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Rasterokulars. Pro Well wurden 10 Raster ausgezählt. Die gezählten migrierten Zellen innerhalb der 10 Raster, welche eine Fläche von insgesamt 5,5  $\text{mm}^2$  abdeckten, wurden gemittelt.

### 2.2.9 Chemotaxis-Versuch mit Kollagenmatrix im Transwell-System

Für den Chemotaxis-Versuch mit Kollagenmatrix im Transwell-System wurde die Kollagenmatrix mit einer Mono-Kultur aus HDMEC oder einer Bi-Kultur aus HDMEC und Fibroblasten besiedelt und in ein Transwell-System überführt. Vor der Zellbesiedlung wurden die Kollagenmatrices für 20 min mit HDMEC-Medium hydriert. Bei der Herstellung der Bi-Kultur wurden die Fibroblasten 24 h vorher auf HDMEC-Medium umgestellt und an Kulturtag 1  $5,6 \times 10^4$  Zellen/Kollagenmatrix in 200  $\mu\text{l}$

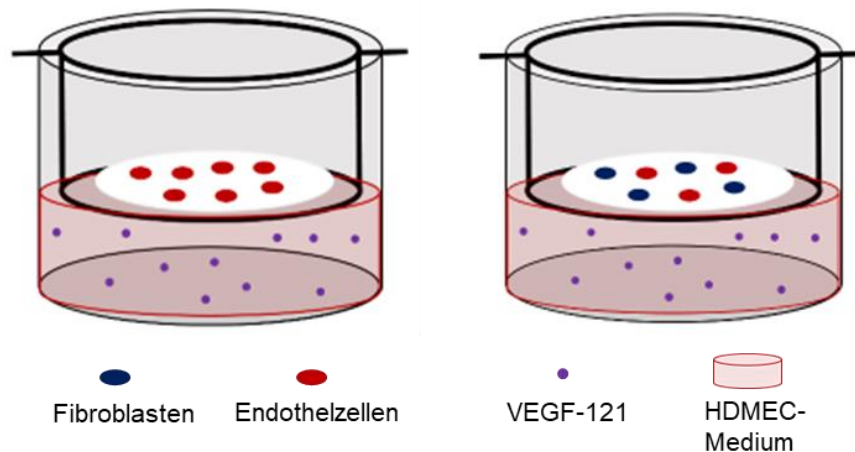
HDMEC-Medium auf die poröse Seite ausgesät. Die HDMEC wurden in einer Konzentration von  $1,12 \times 10^5$  Zellen/Kollagenmatrix in HDMEC-Medium an Kulturtag 2 auf die poröse Seite der Kollagenmatrix ausgesät.

In einem Versuchsansatz wurden 24 h vor der Kollagenmatrix-Besiedlung mit HDMEC  $5,6 \times 10^4$  Fibroblasten in 200  $\mu$ l Medium pro Well des Transwell-Systems ausgesät, um über die von Fibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren einen chemotaktischen Gradienten zu erzeugen. 24 h später wurden die HDMEC in 50  $\mu$ l HDMEC-Medium auf die Kollagenmatrix ausgesät (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix im Transwell-System.** Hergestellt wurden Mono-Kulturen mit HDMEC und Bi-Kulturen mit HDMEC und Fibroblasten. In das Well des Transwell-Systems wurden Fibroblasten zur Sekretion von chemotaktischen Wachstumsfaktoren ausgesät.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde zeitgleich zur Kollagenmatrix-Besiedlung mit HDMEC 25 ng/ml oder 100 ng/ml VEGF-121 in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l HDMEC-Medium in das Well pipettiert. Als Kontrolle für beide Versuchsansätze dienten Ansätze mit Mono- sowie Bi-Kulturen auf der Kollagenmatrix im Transwell-System ohne Fibroblasten oder VEGF-121 im Well (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix im Transwell-System.** Hergestellt wurden Mono-Kulturen mit HDMEC und Bi-Kulturen mit HDMEC und Fibroblasten. In das Well des Transwell-Systems wurden 25 ng/ml oder 100 ng/ml VEGF-121 zur Erzeugung eines chemotaktischen Gradienten hinzugegeben.

Nach 24 h im Transwell-System wurden die Matrices entnommen und in 4 % ROTI®Histofix bei 4 °C für 1 h fixiert. Danach wurde die Kollagenmatrix bis zu einer Färbung in DPBS bei 4 °C gelagert.

### 2.2.10 Chemotaxis-Versuch mit Kollagenmatrix mithilfe eines Kollagen I-Gels

In diesem Versuchsansatz wurde ein Kollagen I-Gel mit VEGF-121 versetzt und die mit Mono-Kulturen aus HDMEC oder Bi-Kulturen aus HDMEC und Fibroblasten besiedelte Kollagenmatrix in HDMEC-Medium darauf platziert. Es wurde untersucht, ob das Kollagen I-Gel über die Zeit VEGF-121 an das darüber liegende Zellkulturmedium abgibt und dadurch einen längerfristigen chemotaktischen Gradienten erzeugen kann.

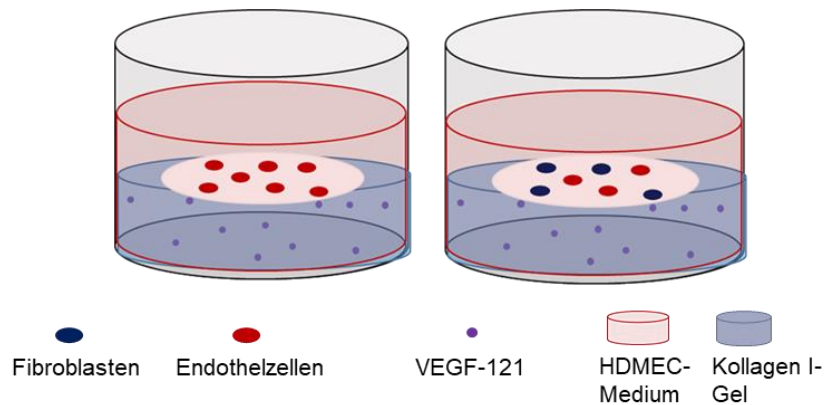
In einem Vorversuch hierfür wurde ermittelt, welche Menge an VEGF-121 aus dem auspolymerisierten Kollagen I-Gel in das darüber liegende Medium ausdiffundiert. Dafür wurde Kollagen I-Gel (3 mg/ml Kollagen I) angesetzt und mit 1 µg/ml VEGF-121 versetzt (Tabelle 15). Das Gel wurde auf Eis angesetzt und das Kollagen I wurde dabei als letztes pipettiert. Bei der Zugabe des Kollagens konnte man einen Farbumschlag von pink zu gelb (saurer pH-Bereich) beobachten. Um den optimalen pH-Wert einzustellen, musste NaOH nachträglich in 1 µl-Schritten hinzu pipettiert werden, bis

sich wieder eine durchgängige Pink-Färbung des Gels (neutraler pH-Bereich) einstellte. Jeweils 100 µl Gel wurden in das Well einer 96-Well-Platte pipettiert und 20 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator auspolymerisieren gelassen. In jedem Well befanden sich somit 100 ng VEGF-121. Das Gel wurde nach dem Auspolymerisieren mit 150 µl DPBS bedeckt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dieser Überstand abgenommen und bei -20 °C eingefroren, um daraufhin mittels ELISA auf VEGF-121 untersucht zu werden.

**Tabelle 15: Zusammensetzung des Kollagen I-Gels mit einer Kollagen I-Konzentration von 3 mg/ml.** Das Gel wurde vor dem Auspolymerisieren mit 1µg/ml VEGF-121 versetzt.

Chemikalie	Volumen (µl) für 1 ml Gel
M199 10x	91,10
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	43,42
NaOH 1N	32,19
Aqua dest.	231,49
Kollagen I	601,79
+ VEGF-121	1 µg

Für den Chemotaxis-Versuch wurde das Kollagen I-Gel angesetzt und mit 1 µg/ml VEGF-121 versetzt. Danach wurden 100 µl des flüssigen Gels in das Well einer 96-Well-Platte pipettiert und 20 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator auspolymerisieren gelassen. In jedem Well befanden sich somit ebenfalls wie in dem Vorversuch 100 ng VEGF-121. Auf das auspolymerisierte Gel wurde die bereits am Vortag mit Fibroblasten besiedelte Kollagenmatrix oder eine leere Kollagenmatrix gelegt. Diese wurden nun mit HDMEC in 150 µl HDMEC-Medium besiedelt und für 24 h inkubieren gelassen (Abbildung 9). Nach diesen 24 h wurden die Matrices mit 4 % ROTI®Histofix bei 4 °C für 1 h fixiert. Danach wurde die Kollagenmatrix bis zur weiteren Analyse in DPBS bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 9: Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix mithilfe von mit Angiogenesefaktoren-versetztem Kollagen I-Gel.** Hergestellt wurden Monokulturen mit HDMEC und Bi-Kulturen mit HDMEC und Fibroblasten. Die zellbesiedelte Kollagenmatrix wurde auf einem Kollagen I-Gel platziert, welches mit 1  $\mu\text{g/ml}$  VEGF-121 versetzt wurde.

### 2.2.11 Analyse der Freisetzungskinetik der Nanopartikel

Verschiedene Menge an Stärke- und HES-Nanopartikeln mit Sulforhodamin-101 (SR-101) oder VEGF-121 wurden in serumfreiem HDMEC-Medium resuspendiert. Jeweils 250  $\mu\text{l}$  wurden als Triplet-Ansatz in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Mittels  $\alpha$ -Amylase kann Stärke verdaut werden. Verschiedene Konzentrationen an  $\alpha$ -Amylase verdünnt in serumfreiem HDMEC-Medium wurde zu den Ansätzen pipettiert. Dies inkubierte für verschiedene Inkubationszeiten bis hin zu einer Woche im  $\text{CO}_2$ -Inkubator. Nach der Inkubationszeit wurde das gesamte Volumen pro Well in ein neues Reagiergefäß überführt und bei 1467 x g, und RT für 30 min zentrifugiert.

Vorsichtig wurden 200  $\mu\text{l}$  der Überstände von den Stärke- und HES-Nanopartikeln mit SR-101 abpipettiert. Dies wurde auf eine frische 96-Well-Platte überführt und mittels des GloMax®-Multi+ Detection Systems gemessen. Die Fluoreszenz der Überstände wurde bei einer Wellenlänge von 580 nm und 640 nm Referenzwellenlänge gemessen.

Auch von den Überständen der Stärke- und HES-Nanopartikel mit VEGF-121 wurden 200  $\mu\text{l}$  abpipettiert. Diese wurden in Reagiergefäße überführt und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Sobald alle zu analysierenden Überstände gesammelt waren, wurden diese mittels VEGF-ELISA nach dem Herstellerprotokoll analysiert und ausgewertet. Die Proben wurden dabei nicht verdünnt.

In einem alternativen Ansatz wurden die Stärke- sowie HES-Nanopartikel während der gesamten Inkubationszeit mit  $\alpha$ -Amylase bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  bei 300 x g auf einem Heizschüttler

mit oder auch ohne Rührstäbchen geschüttelt. In einem weiteren Ansatz wurden die Stärke- und HES-Nanopartikel vor der Analyse der Freisetzung ihres Inhaltes für 10 min mit Ultraschall behandelt.

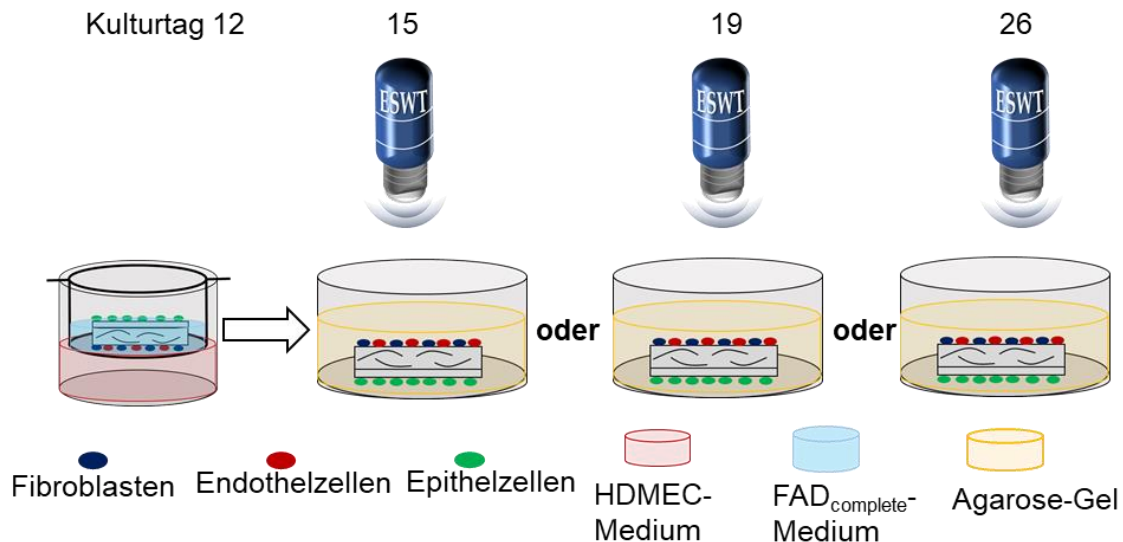
### 2.2.12 Zelinjektion in die Kollagenmatrix

Die Kollagenmatrix wurde wie bereits beschrieben für die Tri-Kultivierung mit Fibroblasten und Epithelzellen besiedelt. Die HDMEC wurden mittels Trypsin-EDTA (0,25 %) aus der Zellkulturflasche abgelöst und  $8 \times 10^5$  in 400  $\mu$ l HDMEC-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mittels Kanüle (30G 1/2) an mehreren Stellen in die Kollagenmatrix in einer 96-Well-Platte liegend injiziert. Die Kanüle wurde dabei auf einen Omnifix®-F Luer Solo gesteckt. Nach 4 h wurde die besiedelte Kollagenmatrix zurück in das Transwell-System überführt und mit den jeweiligen Zellkulturmedien versorgt.

### 2.2.13 ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent

Bei den besiedelten Kollagenmatrices fand an Kulturtag 15, 19 oder 26 eine extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT)-Anwendung statt. Dafür wurde ein 1 % Agarose-Gel in das Well einer 6-Well-Platte gegossen. Daraus wurde eine Fläche mit der Größe der Kollagenmatrix ausgestanzt. Die besiedelte Matrix wurde in den ausgestanzten Bereich gelegt und mit einem Gel-Pfropf bedeckt, so dass sie durch die Stoßwellen nicht weggedrückt werden konnte. Der Kopf des Stoßwellengeräts wurde direkt auf das Agarose-Gel gehalten. Die Kollagenmatrix wurde über das Gel mit einem Luftdruck von 3,0 bar, einer Frequenz von 5 Hz, einer Energieflussdichte von  $0,12 \text{ mJ/mm}^2$  und 500 Impulsen beschossen (Abbildung 10). Danach wurde die Matrix zurück in das Transwell-System überführt und bis zum Kulturende an Kulturtag 33 weiterkultiviert. Danach wurden die Matrices mit 4 % ROTI®Histofix bei 4 °C für 1 h fixiert. Dann wurde die Kollagenmatrix bis zu einer Färbung in DPBS bei 4 °C gelagert.





**Abbildung 10: Schematische Darstellung der ESWT-Anwendung der zellbesiedelten Kollagenmatrices.** Bei den Kollagenmatrices fand an Kulturtag 15, 19 oder 26 der Zellkultivierung eine extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT)-Anwendung statt. Nach der Behandlung wurden die Matrices bis zum Kultivierungsende zurück in das Transwell-System überführt (Teile dieser Abbildung wurden von Frau Dr. med. Diana Heimes aus der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz angefertigt und zur Verfügung gestellt).

### 2.2.14 CD31-Fluoreszenzfärbung des Mundschleimhaut-Äquivalents

Die fixierten Matrices wurden zunächst dreimal mit DPBS für jeweils 10 min bei RT und 300 rpm auf dem Thermoschüttler gewaschen. Danach wurden die Matrices für 20 min in 0,2 % Triton-X in DPBS bei RT inkubiert, wobei die Zellen permeabilisiert wurden. Anschließend wurden die Matrices erneut dreimal für 10 min bei 300 rpm auf dem Thermoschüttler mit DPBS gewaschen und es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Hierbei wurde der Antikörper anti-CD31 1:50 in einer 1 % BSA-DPBS-Lösung verdünnt und jeweils 200 µl auf die Matrices pipettiert. Dies inkubierte für 1 h bei RT auf dem Schüttler und danach bei 4 °C über Nacht auf dem Thermoschüttler bei 300 rpm. Am nächsten Tag wurden die Matrices erneut dreimal für 10 min mit DPBS gewaschen. Der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 wurde 1:200 in einer 1 % BSA-DPBS-Lösung verdünnt und jeweils 200 µl auf die Matrices pipettiert. Dies inkubierte für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Die Matrices wurden wiederholt dreimal 7 x mit DPBS gewaschen und bis zur Fluoreszenzmikroskopie dunkel in DPBS kühl gelagert. Als Fluoreszenzmikroskop wurde das TCS SP8 verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software Fiji bearbeitet.

### 2.2.15 Charakterisierung der isolierten Zellen aus dem Vollblut

Die isolierten Primärzellen aus dem peripheren Blut wurden auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellisolation wurden die Zellen mit ROTI®Histofix bei 4 °C für 1 h fixiert. Danach wurden die Zellen mit 1,5 ml DPBS gewaschen. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte über eine Antikörper-Färbung. Für die Antikörper-Färbung wurden verschiedene Fluoreszenz-gekoppelte Primärantikörper mit DPBS verdünnt (aufgelistete Konzentrationen in Tabelle 7) und zusammen für eine Dreifachfärbung auf die Zellen gegeben. Hierbei handelte es sich um Antikörper, die an das Zelloberflächenprotein CD14, CD31 und CD133 banden. Um unspezifische Antikörperbindungen zu erfassen, wurden weitere Wells mit den Zellen mit den jeweiligen Isotypkontroll-Antikörpern behandelt. In jedes Well wurde 1 ml der Antikörper-Lösung oder der Lösung der Isotypkontroll-Antikörper gegeben. Dies inkubierte für 30 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Danach wurden die Antikörper-Lösungen entfernt, die Wells mit DPBS gewaschen und 2 ml frisches DPBS auf die Zellen gegeben. Als Fluoreszenzmikroskop wurde das TCS SP8 verwendet. Die Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde mit der Software Fiji erzeugt.

### 2.2.16 Chorioallantoismembran-Assay

Befruchtete Leghorn Hühnereier wurden nach ihrer Ankunft im Labor vorsichtig mit einer hochverdünnten Ethanol-Lösung gereinigt und in Querlage in den Brutautomaten gelegt. Dieser wurde auf 38,5 °C beheizt und hatte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Vor der Bestückung der Chorioallantoismembran (CAM) mit den Zell-besiedelten Kollagenmatrices mussten die Eier 4 Tage im Brutautomat vorinkubieren, bis sie sich an Embryonaltag 4 befanden. Am 3. Inkubationstag (3. Embryonaltag) wurde am stumpfen Pol des Eis 6 ml Eiklar mit einer Kanüle abgezogen. Danach wurde die Einstichstelle mit Leukosilk verschlossen. Auf die oberliegende Seite des Eis wurden zwei Streifen des Leukosilks übereinander geklebt und in diesem Bereich ein etwa 2-3 cm großes ovales Fenster aus der Eischale geschnitten. Das Fenster wurde mit Parafilm verschlossen. Am 4. Inkubationstag wurde die CAM mit besiedelten Kollagenmatrices bestückt. Dafür wurde die Kollagenmatrix innerhalb der CAM an den Randbereich auf der entgegengesetzten Seite der Luftkammer des Eis gelegt. Dabei lag die Matrix mit der porösen Seite auf der CAM auf und die glatte, zellokklusive Seite zeigte nach oben und hatte Luftkontakt. Die Mundschleimhaut-Äquivalente blieben bis

zum 9. bis 14. Embryonaltag auf der CAM, je nach Überlebenszeit des Embryos. Für das Abpräparieren der Kollagenmatrix sowie der anliegenden CAM wurde die CAM mit einer Pinzette gefasst und mit einer Schere ausgeschnitten. Die Probe wurde mittels Spatel auf ein gefaltetes TissueTek® Einbettpapier überführt, in eine Einbettkassette überführt, 1 h mit 4 % ROTI®Histofix bei 4 °C fixiert und daraufhin in DPBS überführt. Es folgte das Einbetten der Proben in Paraffin, sowie das Schneiden und Färben der Proben wie unter Punkt 2.2.17 beschrieben.

### 2.2.17 Immunhistochemische Färbung des Mundschleimhaut-Äquivalents

Die mit ROTI®Histofix fixierten Kollagenmatrices wurden für die immunhistochemischen Färbungen eingebettet und geschnitten. Zum Einbetten der Proben in Paraffin wurden diese in Einbettkassetten gelegt und in den Tissue-Tek VIP Einbettautomaten überführt. Dort durchlaufen sie eine aufsteigende Alkoholreihe mit abschließender Xylol-Inkubation (Tabelle 16). Danach wurden die Proben an der Tissue-Tek Thermal-, Dispensing- und Kryo-Konsole in Paraffinblöckchen eingebettet.

**Tabelle 16: Aufsteigende Alkoholreihe zur Einbettung der fixierten Kollagenmatrices in Paraffin.**

Zyklus	Substanz	Temperatur	Dauer
1 x	Ethanol 50 %	40 °C	1 Stunde
1 x	Ethanol 70 %	40 °C	1 Stunde
1 x	Ethanol 80 %	40 °C	1 Stunde
1 x	Ethanol 90 %	40 °C	1 Stunde
2 x	Ethanol 100 %	40 °C	1 Stunde
3 x	Xylol	40 °C	1 Stunde

Danach wurden die Proben senkrecht zur porösen und glatten, okklusiven Seite am Schlitten-Mikrotom in 4 µm dünne Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in Aqua dest. überführt und auf Objektträgern platziert. Danach kamen die Objektträger in ein 50 °C warmes Wasserbad und wurden daraufhin bei 60 °C für 1-2 Stunden erhitzt. Die Schnitte wurden anschließend zunächst mit einer absteigenden alkoholischen Reihe hydratisiert und das Paraffin entfernt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinisierung der Schnitte der Kollagenmatrixes.

Lösung	Dauer
Xylol	3 x 10 min
100 % Ethanol	2 x 2 min
96 % Ethanol	2 x 2 min
70 % Ethanol	1 x 2 min
Aqua dest.	1 x 1 min

Im Anschluss folgte die Hitzedemaskierung. Dafür wurden die Schnitte mit *1X high buffer* (pH 9) in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) in eine Küvette überführt. Die mit Schnitten befüllte Küvette wurde für 10 min in einen vorgeheizten Dampfgarer gestellt. Die Küvette wurde aus dem Dampfgarer entnommen, für 20 min abkühlen gelassen und anschließend zweimal mit VE-Wasser gespült. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase. Dafür wurden die Proben auf den Objektträgern mit einem Fettstift eingekreist und in eine Feuchtkammer gelegt. Eine 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in VE-Wasser wurde frisch angesetzt und auf die Schnitte innerhalb des mit Fettstift eingekreisten Bereichs gegeben. Dies inkubierte für 10 min bei RT. Danach wurden die Schnitte erneut zweimal mit Aqua dest. und einmal mit DPBS gewaschen und unspezifische Antikörperbindungen blockiert, indem eine 1 % BSA-Lösung in DPBS auf die Schnitte gegeben wurde. Dies inkubierte in der Feuchtkammer bei RT für 1 h. Danach wurden die Schnitte wiederholt zweimal mit VE-Wasser gespült.

Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (CD31, vWF, Tenascin, Kollagen IV, Laminin, Occludin, Zytokeratin 19, Zytokeratin 13, Involucrin). Der Antikörper wurde mit der Envision Antibody Solution verdünnt (jeweilige Verdünnungen in Tabelle 7 aufgelistet) und auf die Schnitte aufgetragen. Dies inkubierte in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht. Die Schnitte wurden dreimal für 2 min mit DPBS gewaschen. Daraufhin fand die Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung (Dako Real Envision; gebrauchsfertig) statt. Dies inkubierte in der Feuchtkammer bei RT für 30 min. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal für 2 min mit DPBS gewaschen und es folgte die DAB-Färbung. Die Schnitte wurden für maximal 3 min mit der DAB-Lösung (DAB 1:50 im DAB-Puffer) inkubiert, bis sich die Färbung zeigte. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit Aqua. dest. für 2 min gewaschen. Dann folgte die Zellkernfärbung mit Mayers Hämalaun für ca. 10 min. Danach wurden die Schnitte zum Spülen 10 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und einmal mit VE-Wasser gespült. Dann folgte eine Dehydrierung durch eine

aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 18). Zum Schluss wurden die Schnitte mit Hico-Mic eingedeckt und konnten mittels Lichtmikroskopie beurteilt und fotografiert werden.

**Tabelle 18: Aufsteigende Alkoholreihe zum Eindecken der immunhistochemisch gefärbten Kollagenmatrices.**

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
70 % Ethanol	2 x 2 min
96 % Ethanol	1 x 2 min
100 % Ethanol	2 x 2 min
Xylol	3 x 5 min

### 2.2.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in Microsoft Excel 2016 ausgeführt. Alle Versuche wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Bei Analysen der Sulforhodamin-101- und VEGF-121-Freisetzung wurden jeweils Triplet-Ansätze durchgeführt. Von den jeweiligen Messungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen *Student's* T-test berechnet. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Primärzell-Isolation aus Patientinnen- und Patientenmaterial

Für die Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente wurden drei verschiedene Zelltypen verwendet. Diese wurden als Primärzellen direkt aus Patientinnen- und Patientenmaterial isoliert. Die Isolation von Fibroblasten und Epithelzellen erfolgte aus gesunden Mundschleimhautgeweben, welche als Stanzbiopsate gewonnen wurden. Die Isolation der Endothelzellen erfolgte zum einen aus juvenilen Vorhäuten, welche bei Zirkumzisionen gewonnen wurden. Dabei wurden die sogenannten humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) isoliert. Zum anderen wurden endotheliale kolonieformende Vorläuferzellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC) aus Vollblutspenden isoliert.

##### 3.1.1 Fibroblasten-Isolation aus der Mundschleimhaut

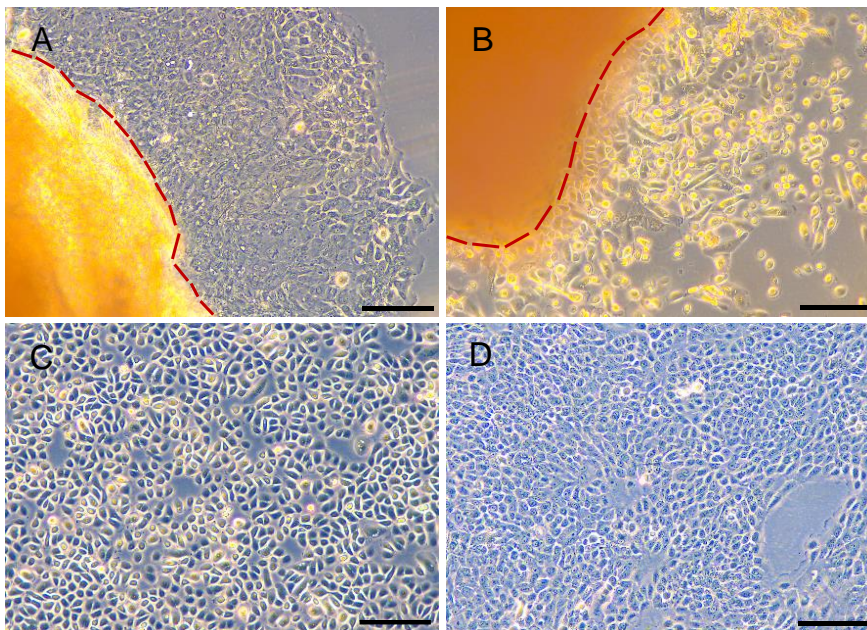
Die Fibroblasten fingen drei Tage nach der Präparation des Patientinnen- und Patientenmaterials an aus der Bindegewebschicht der Mundschleimhautgewebe auszuwachsen (Abbildung 11 A). Durch die Umstellung von FAD<sub>complete</sub>-Medium auf Fibroblasten-Medium konnte das Wachstum einer reinen Fibroblasten-Kultur erzielt werden (Abbildung 11 B). Nach 14 Tagen war eine konfluente Fibroblasten-Kultur erreicht, bei der sich die Zellen eng aneinanderlagerten (Abbildung 11 C). Die Isolation der Fibroblasten war erfolgreich und die Zellen konnten somit 14 Tage nach ihrer Isolation für Versuche verwendet werden.



**Abbildung 11: Darstellung der isolierten Fibroblasten aus humaner Mundschleimhaut.** A) Die Fibroblasten wuchsen nach drei Tagen aus der Bindegewebschicht der Mundschleimhaut (rot gestrichelt) aus. B) Nach dem Auswachsen der Zellen wurden diese von FAD<sub>complete</sub>-Medium auf Fibroblasten-Medium umgestellt. C) Nach 14 Tagen war eine konfluente Fibroblasten-Kultur erreicht. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

### 3.1.2 Epithelzell-Isolation aus der Mundschleimhaut

Die Epithelzellen fingen ebenfalls drei Tagen nach der Präparation des Patientinnen- und Patientenmaterials an aus der Epithelschicht der Mundschleimhautgewebe auszuwachsen (Abbildung 12 A). Nach der Umstellung von FAD<sub>complete</sub>-Medium auf Epithelzell-Medium lösten sich die Zellen zunächst aus ihrem Zellverband (Abbildung 12 B). Nach wenigen Tagen schlossen sie sich zu einem neuen Zellverband zusammen und nahmen die für Epithelzellen charakteristische Kopfsteinpflaster-Morphologie an (Abbildung 12 C). Für die Anwendung der Epithelzellen zur Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente erfolgte erneut die Umstellung auf FAD<sub>complete</sub>-Medium. Dabei änderten die Zellen ihre Morphologie. Sie saßen flacher am Boden der Zellkulturflasche fest und erschienen in der mikroskopischen Betrachtung weniger dreidimensional als im Epithelzell-Medium (Abbildung 12 D). Die Isolation der Epithelzellen aus Mundschleimhaut war somit ebenfalls erfolgreich und die Zellen konnten 14 Tage nach ihrer Isolation für Versuche verwendet werden.

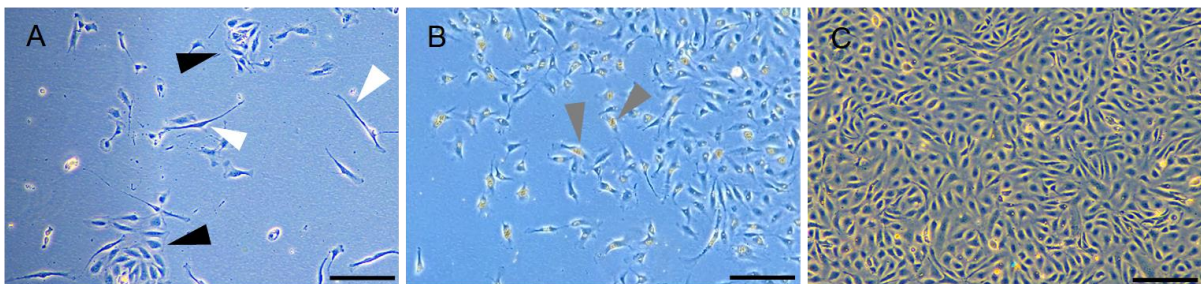


**Abbildung 12: Darstellung der isolierten Epithelzellen aus humaner Mundschleimhaut.** A) Die Epithelzellen wuchsen nach drei Tagen aus der Epithelschicht der Mundschleimhaut (rot gestrichelt) aus. B) Nach dem Auswachsen der Zellen wurden diese von FAD<sub>complete</sub>-Medium auf CnT-Prime-Medium (Epithelzell-Medium) umgestellt. C) Innerhalb der Kultivierung der Epithelzellen mit Epithelzell-Medium zeigte diese eine charakteristische Kopfsteinpflaster-Morphologie. D) Für die Anwendung der Epithelzellen zur Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente erfolgte die Umstellung auf FAD<sub>complete</sub>-Medium. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

### 3.1.3 Endothelzell-Isolation

#### 3.1.3.1 HDMEC-Isolation aus der juvenilen Vorhaut

Bei der Isolation von humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) konnte eine Kontamination mit Fibroblasten nicht vermieden werden. Diese ließen sich morphologisch eindeutig voneinander unterscheiden (Abbildung 13 A). Durch die CD31-Magnetbead-Isolation sieben Tage nach der Präparation der Patientinnen- und Patientengewebe, konnte die Isolation der Endothelzellen erreicht und die Kultivierung einer reinen Endothelzell-Kultur erzielt werden (Abbildung 13 B). Nach insgesamt 14 Tagen war eine konfluente Endothelzellkultur erreicht (Abbildung 13 C). Die Isolation der Endothelzelle aus juveniler Vorhaut war erfolgreich und die Zellen konnten somit 14 Tage nach ihrer Isolation für Versuche verwendet werden.



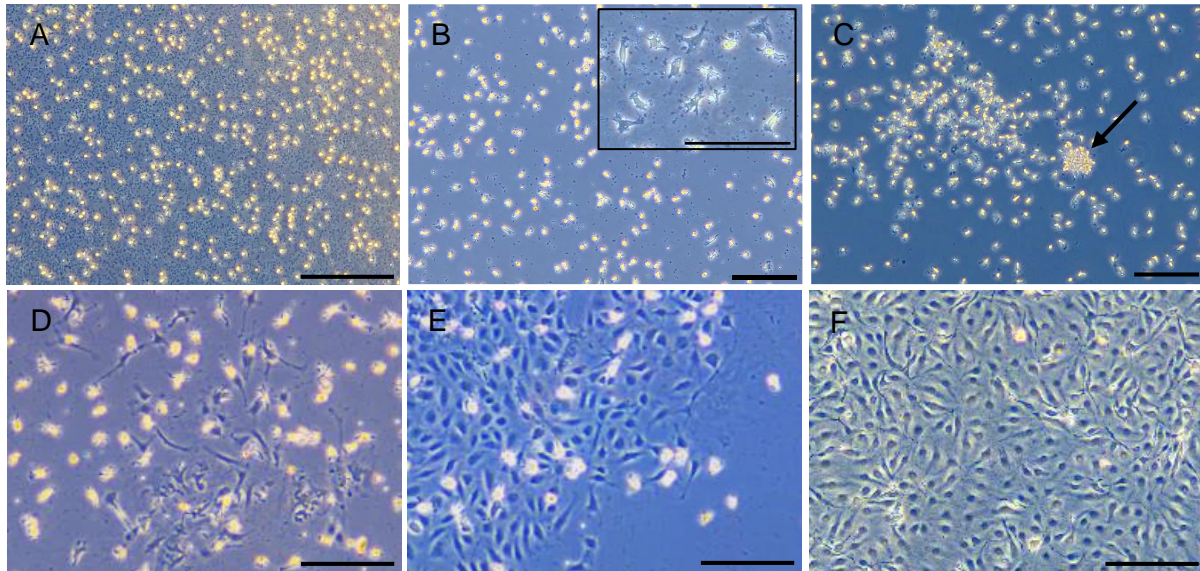
**Abbildung 13: Darstellung der isolierten humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) aus juveniler Vorhaut.** A) Bei der Zellisolation ergab sich eine Mischkultur aus HDMEC (schwarze Pfeilspitze) und Fibroblasten (weiße Pfeilspitze). B) Um die Endothelzellen aus der Zellkultur heraus zu selektionieren, wurde eine CD31-Magnetbead-Isolation durchgeführt. Die CD31-Magnetbeads (graue Pfeilspitze) banden an der Oberfläche der Endothelzellen. C) Nach der CD31-Magnetbead-Isolation wuchs eine reine Endothelzellkultur heran. Die Magnetbeads lösten sich mit der Zeit wieder von den Zellen ab. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.3.2 ECFC-Isolation aus Vollblut

Die Isolation der endothelialen kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) dauerte von der Präparation der Vollblutspenden bis hin zu einer konfluente Zellkultur ca. 28 Tage. Drei Tage nach der Isolation waren viele unbestimmte Zellen zu erkennen (Abbildung 14 A). Bei den täglichen Waschschrinen mit DPBS und der anschließenden Zugabe von frischem ECFC-Medium lösten sich Zellen ab. Sieben Tage nach der Isolation war die Anzahl der adhärennten Zellen deutlich verringert und ein Großteil der adhärennten Zellen besaß eine spindelförmige Morphologie (Abbildung 14 B). Etwa zehn Tage nach der Isolation bildeten sich die ersten charakteristischen Zellkolonien aus (Abbildung 14 C). Nach etwa 14 bis 21 Tagen waren die ersten adulten Endothelzellen mit einer charakteristischen Kopfsteinpflaster-Morphologie erkennbar (Abbildung 14 D und E). Nach ca. 28 Tagen war eine konfluente Zellkultur aus adulten



Endothelzellen erreicht (Abbildung 14 F). Die Isolation der Endothelzellen aus Vollblutspenden war somit ebenfalls erfolgreich. Die Zellen konnten ca. 28 Tage nach ihrer Isolation für Versuche verwendet werden.

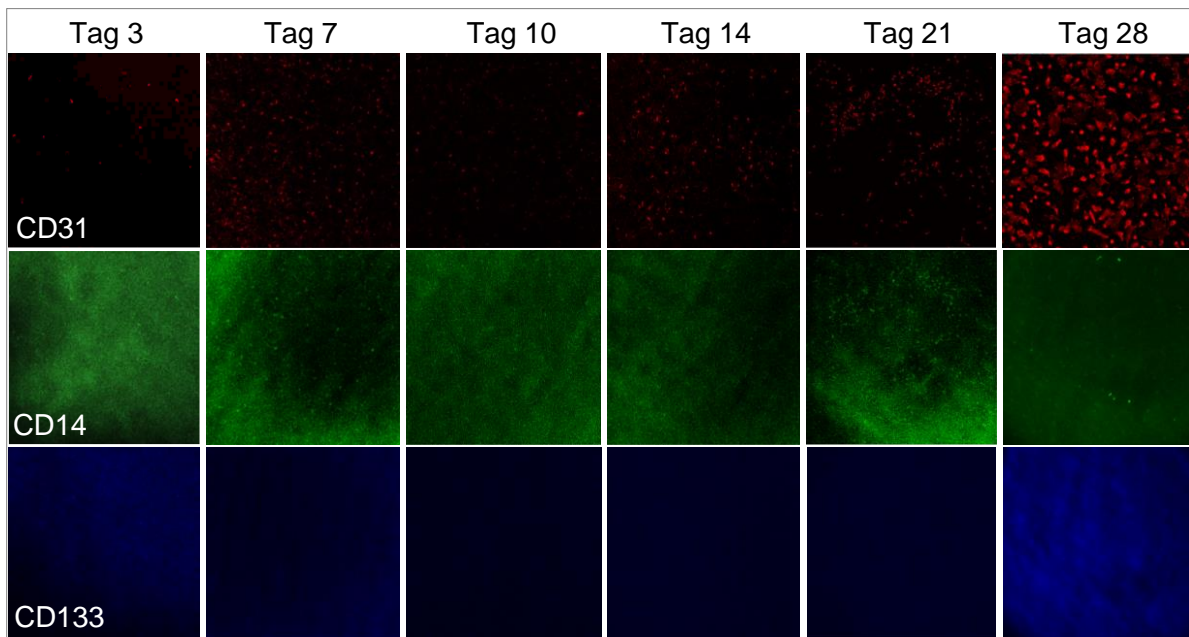


**Abbildung 14: Darstellung der isolierten endothelialen, kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus Vollblut.** A) Drei Tage nach der Isolation waren viele unbestimmte Zellen vorhanden. B) Sieben Tage nach der Isolation war die Anzahl der adhärenenten Zellen deutlich verringert. C) Nach ca. zehn Tagen bildeten sich die ersten charakteristischen Zellkolonien (schwarzer Pfeil) aus. D) und E) Nach ca. 14 Tagen und 21 Tagen waren die ersten Zellen mit klarer Endothelzell-Morphologie erkennbar. F) Nach ca. 28 Tagen war eine konfluente Zellkultur aus adulten Endothelzellen erreicht. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.2.1 Charakterisierung der ECFC

Für die Charakterisierung der ECFC wurden die Zellen aus dem Vollblut jeweils 3, 7, 10, 14, 21 sowie 28 Tagen nach ihrer Isolation mit Antikörpern markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden endotheliale Zellen mittels CD31-Antikörper detektiert. Drei Tage nach der Isolation war kaum eine CD31-Expression nachzuweisen. Nach sieben Tagen waren viele Zellen CD31-positiv. Zehn Tage nach der Isolation war die Anzahl der CD31-positiven Zellen geringer als nach sieben Tagen. Ab 14 Tagen nach der Isolation stieg die Anzahl an CD31-positiven Zellen an. Nach 28 Tagen waren alle vorhandenen Zellen CD31-positiv (Abbildung 15). CD14 ist ein Oberflächenprotein, welches vor allem von Monozyten aber auch von ECFC exprimiert wird. Es wurde erwartet, dass die isolierten ECFC in der früheren Phase der Kultivierung CD14-positiv sind und als adulte Endothelzellen CD14-negativ. Drei Tage nach der Isolation bis hin zu 21 Tage nach der Isolation waren alle Zellen, die CD31-positiv waren, ebenfalls CD14-positiv. Die adulten Endothelzellen an Tag 28 nach der

Isolation waren CD14-negativ (Abbildung 15). Stammzellen sind CD133-positiv. Es war zu erwarten, dass die isolierten ECFC in der früheren Phase der Kultivierung CD133-positiv sind und als adulte Endothelzellen CD133-negativ. Der CD133-Nachweis fiel drei Tage bis hin zu 28 Tage nach der Isolation negativ aus (Abbildung 15). Das Nichtvorhandensein von CD133 auf der Oberfläche der isolierten Zellen konnte nicht durch eine Positivkontrolle verifiziert werden, da keine zur Verfügung stand.



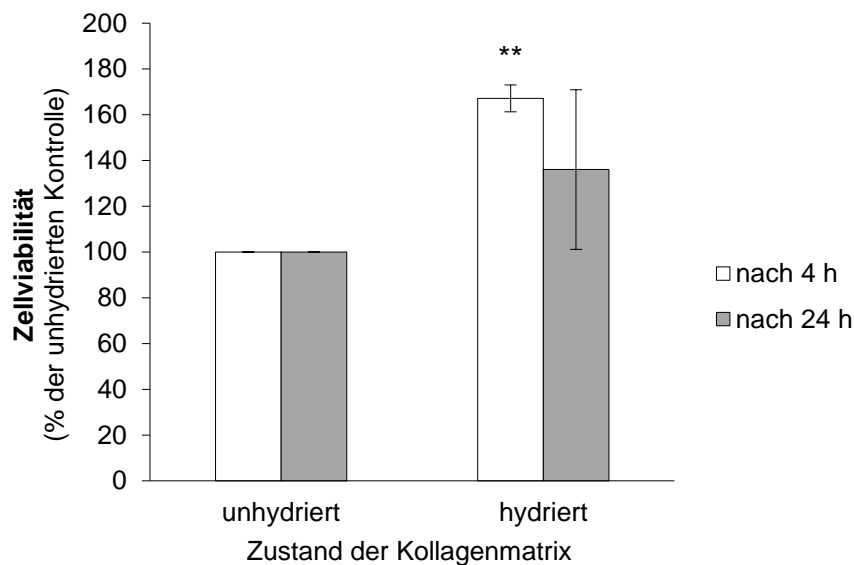
**Abbildung 15: Charakterisierung der endothelialen, kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus dem Vollblut mittels Fluoreszenzfärbung von CD31-, CD14- sowie CD133-Antikörpern (Dreifachfärbung) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Isolation.** Hierfür dienten CD31-Antikörper als Endothelzellmarker. Die isolierten Zellen sollten zu frühen Zeitpunkten nach der Isolation CD14-positiv sein und die adulten Endothelzellen CD14-negativ; gleiches galt für CD133. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei Durchgängen.

## 3.2 Analyse des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vitro*

### 3.2.1 Hydrierung der Kollagenmatrix

Für die Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente wurden Kollagenmatrices als *Scaffolds* verwendet. Es wurde untersucht, ob die Hydrierung der trockenen Kollagenmatrices mit Zellkulturmedium vor dem Aussäen des ersten Zelltyps einen Vorteil für die Zellviabilität hat. Als erster Zelltyp wurden für die Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente Fibroblasten in HDMEC-Medium ausgesät. Die Hydrierung der Kollagenmatrix mit HDMEC-Medium vor dem Aussäen der Fibroblasten führte 4 h nach dem Aussäen zu einer signifikanten Steigerung der

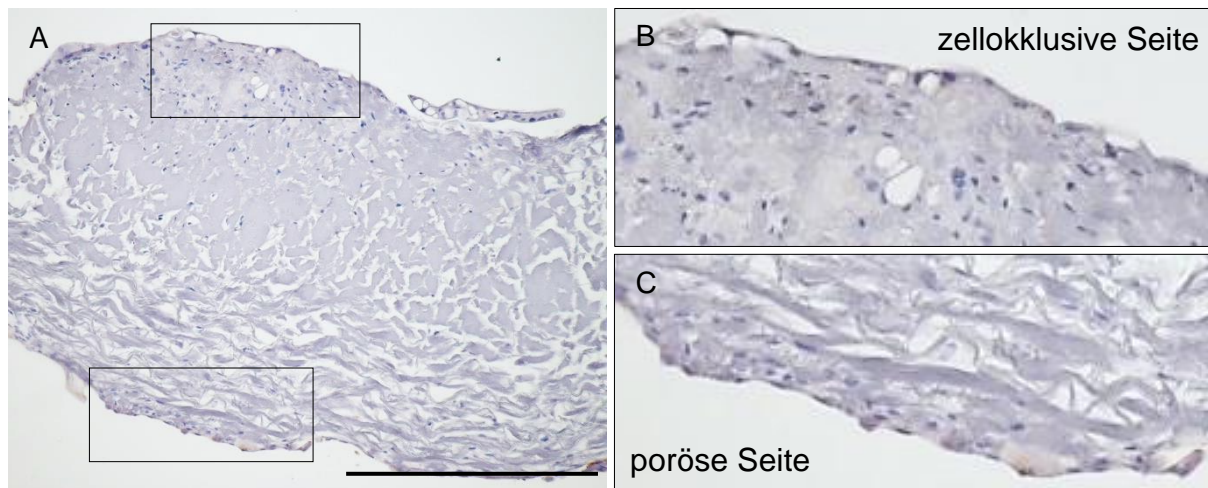
Zellviabilität um 67 % im Vergleich zu den Zellen der unhydrierten Kontrolle. 24 h nach dem Aussäen war die Zellviabilität der hydrierten Proben um 36 % erhöht im Vergleich zur unhydrierten Kontrolle (Abbildung 16). Die Hydrierung führte zum Aufquellen der Kollagenmatrices vor dem Aussäen der Zellen. Dies schien für die Zellviabilität der Fibroblasten innerhalb der Mundschleimhaut-Äquivalent-Herstellung von großem Vorteil zu sein. Für die folgenden Versuche wurden alle Kollagenmatrices vor dem Aussäen der Zellen mit HDMEC-Medium hydriert.



**Abbildung 16: Zellviabilität der Fibroblasten auf hydrierten und unhydrierten Kollagenmatrices 4 h und 24 h nach dem Aussäen.** Die Kollagenmatrices wurden vor dem Aussäen der Zellen mit HDMEC-Medium hydriert. Als Kontrolle dienten unhydrierte Kollagenmatrices. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die Kontrolle, sowie die Standardabweichungen aus drei Versuchsdurchgängen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*\*  $p < 0,01$ . Die mit Sternchen markierte Signifikanz bezieht sich auf die jeweilige Kontrolle.

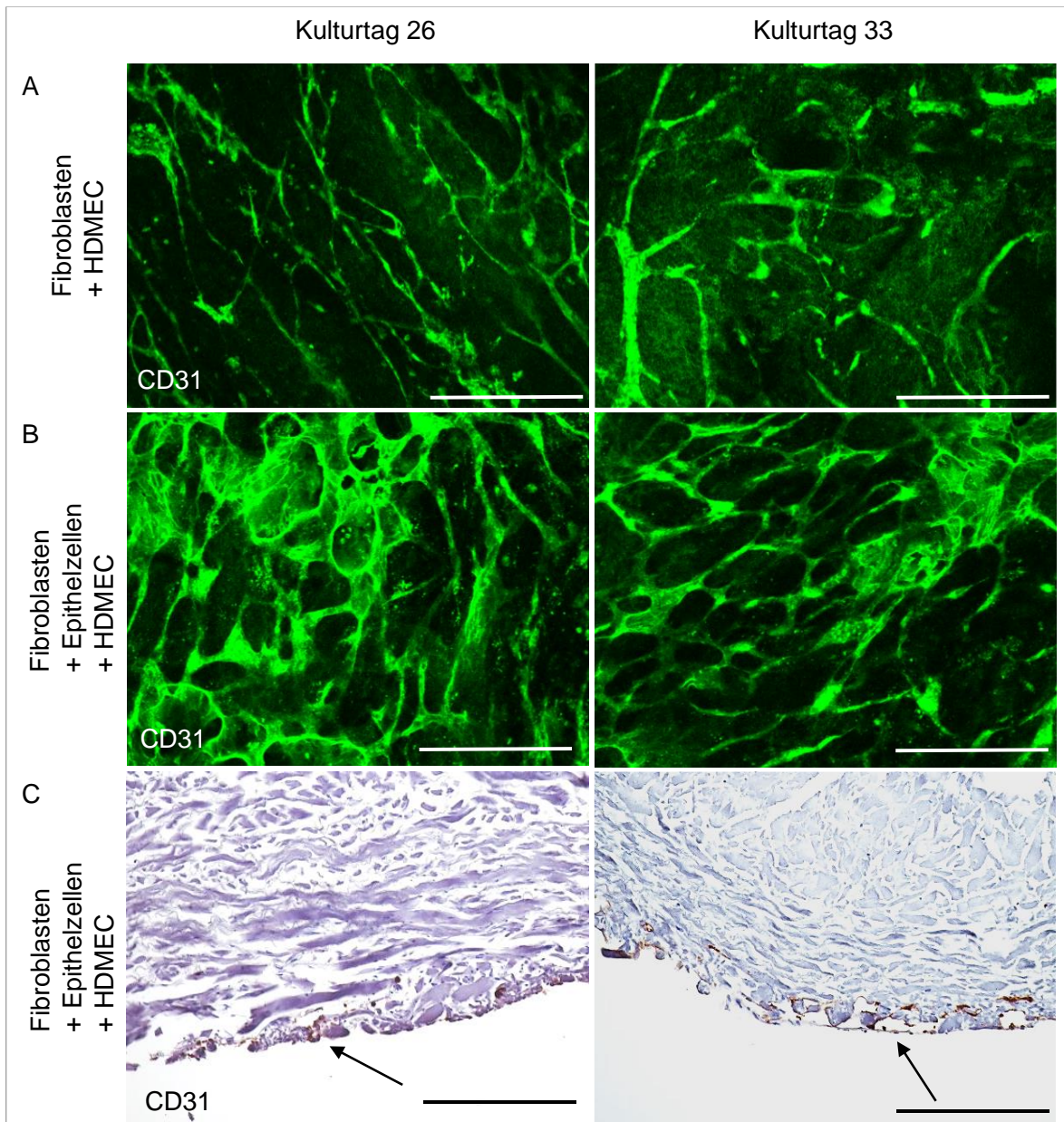
### 3.2.2 Struktureller Aufbau des Mundschleimhaut-Äquivalents

Die Kollagenmatrix, welche als *Scaffold* für die Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente verwendet wurde, hatte eine bilayer Struktur (Abbildung 17 A). Auf die glatte, zelloklusive Seite der Kollagenmatrix wurden die Epithelzellen ausgesät (Abbildung 17 B). Auf die poröse Seite der Matrix wurden die Fibroblasten, sowie die Endothelzellen ausgesät (Abbildung 17 C).



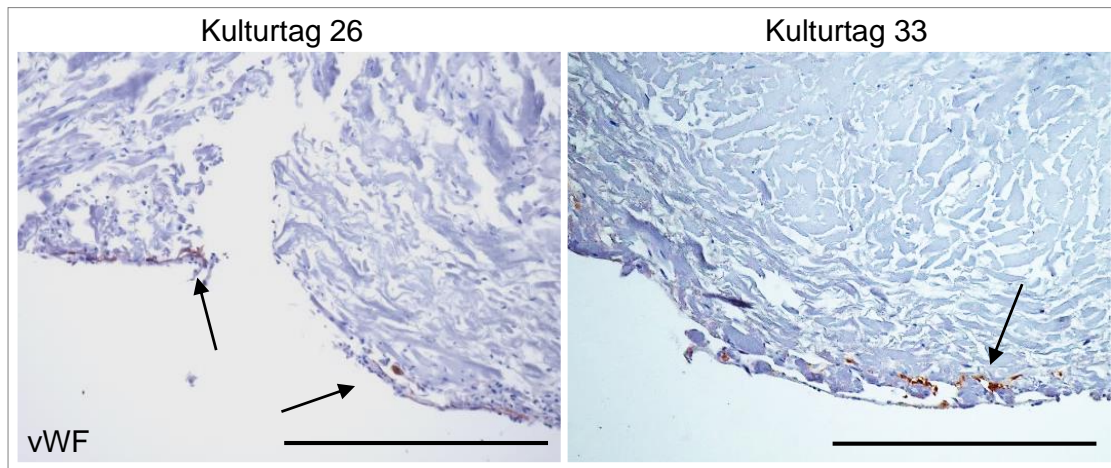
**Abbildung 17: Darstellung der bilayer Struktur der Zell-besiedelten Kollagenmatrix.** A) Das Mundschleimhaut-Äquivalent, welche aus einer Tri-Kultur auf der Kollagenmatrix besteht, wurde geschnitten und mit Hämalaun gefärbt. Die glatte, zellokklusive Seite ist nach oben und die poröse Seite nach unten orientiert dargestellt. B) Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt der glatten, zellokklusiven Seite aus A. C) Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt der porösen Seite aus A. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

**3.2.2.1 Ausbildung von Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent**  
 Für die Ausbildung von Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent wurden an Kulturtag 12 Endothelzellen auf die Kollagenmatrix ausgesät. In einer Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC (Abbildung 18 A) sowie in einer Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC (Abbildung 18 B) bildeten sich bis Kulturtag 26 Gefäßstrukturen aus. Die Gefäßstrukturen formten sich bis zum Kulturende an Tag 33 weiter aus. Die Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent waren an Kulturtag 26 oberflächlich auf der porösen Seite der Kollagenmatrix lokalisiert. An Kulturtag 33 waren die Gefäßstrukturen etwas tiefer lokalisiert und die Lumen der Strukturen waren immunhistochemisch deutlich erkennbar (Abbildung 18 C).



**Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Darstellung der Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 26 und 33.** Hierfür wurde ein CD31-Antikörper als Marker für Endothelzellen verwendet. A) Zum einen wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC an Kulturtag 26 und 33 CD31-markiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. B) Die Gefäßausbildung von HDMEC in Tri-Kulturen zusammen mit Fibroblasten und Epithelzellen an Kulturtag 26 und 33 wurde ebenfalls mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. C) Die Lokalisation der HDMEC (Pfeile) im Mundschleimhaut-Äquivalent (Tri-Kultur zusammen mit Fibroblasten und Epithelzellen) wurde mittels immunhistochemischer CD31-Färbung detektiert. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde vier Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

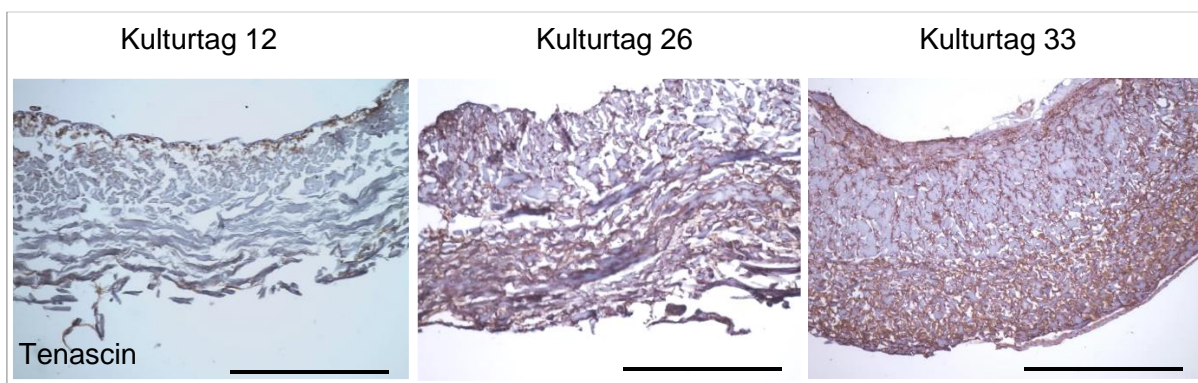
Die Gefäßstrukturen zeigten an Kulturtag 26 sowie an Kulturtag 33 eine vWF-Ausprägung (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Immunhistochemischen Färbungen von vWF des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 26 und 33.** vWF wurde als Marker für Endothelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2.2 Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent

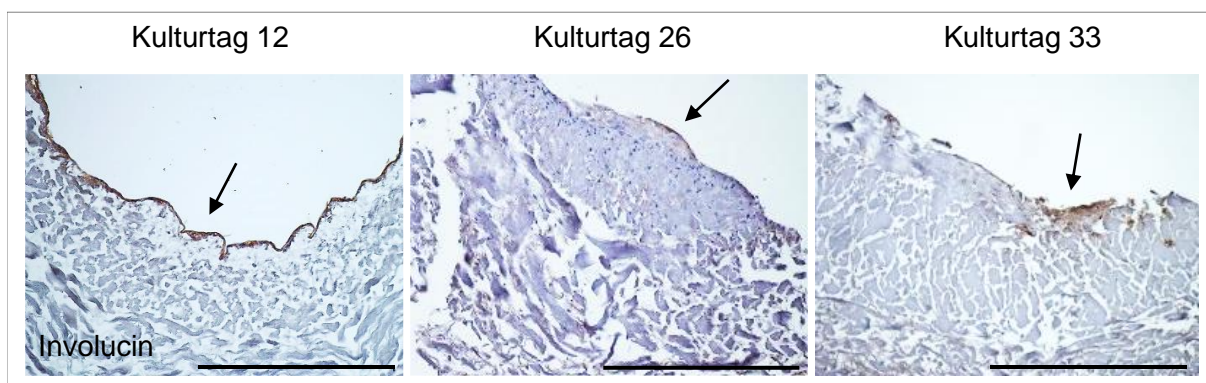
Ein indirekter Nachweis der Fibroblasten und ihrer Funktionalität zur Ausbildung der extrazellulären Matrix im Mundschleimhaut-Äquivalent wurde durch eine immunhistochemische Tenascin-Färbung an Kulturtag 12, 26 und 33 dargestellt. An Kulturtag 12 war die Tenascin-Färbung in oberflächlichen Bereichen des Mundschleimhaut-Äquivalents nachweisbar. An Kulturtag 26 bis hin zu Kulturtag 33 nahm die Tenascin-Verteilung im Mundschleimhaut-Äquivalent deutlich zu und war bis in die Tiefe des gesamten Mundschleimhaut-Äquivalents nachweisbar (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von Tenascin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Tenascin diente dem Nachweis der Ausbildung der extrazellulären Matrix und dem indirekten Nachweis von Fibroblasten. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

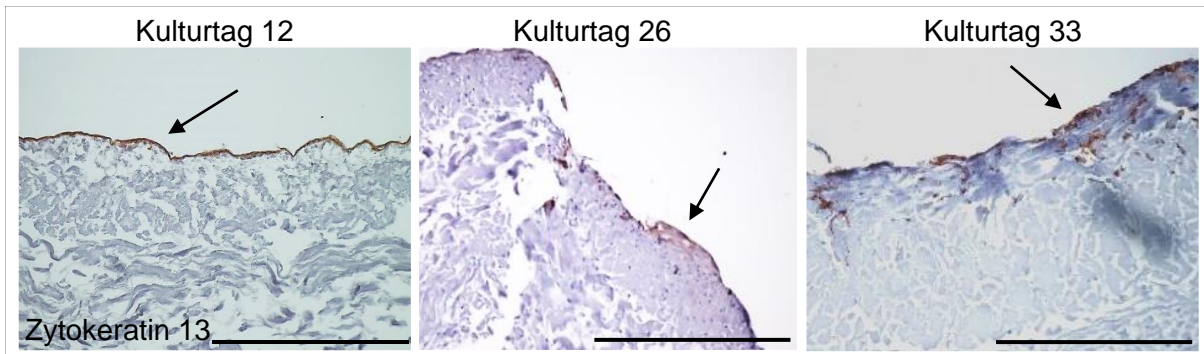
### 3.2.2.3 Epithelausbildung des Mundschleimhaut-Äquivalents

Die Epithelausbildung des Mundschleimhaut-Äquivalents wurde durch immunhistochemische Involucrin-, Zytokeratin 13- sowie Zytokeratin 19- Färbungen beurteilt. Involucrin wurde als Marker für vollständig ausdifferenzierte Epithelzellen verwendet. An Kulturtag 12 war eine kräftige, oberflächliche Involucrin-Färbung auf der zelloklusiven Seite des Mundschleimhaut-Äquivalents vorhanden. An Kulturtag 26 war die Involucrin-Färbung zwar schwächer in ihrer Intensität, aber in einer breiteren Schicht vorhanden als an Kulturtag 12. An Kulturtag 33 war Involucrin nicht mehr in einer durchgehenden Linie, aber stellenweise in einer breiten Schicht vorhanden (Abbildung 21).



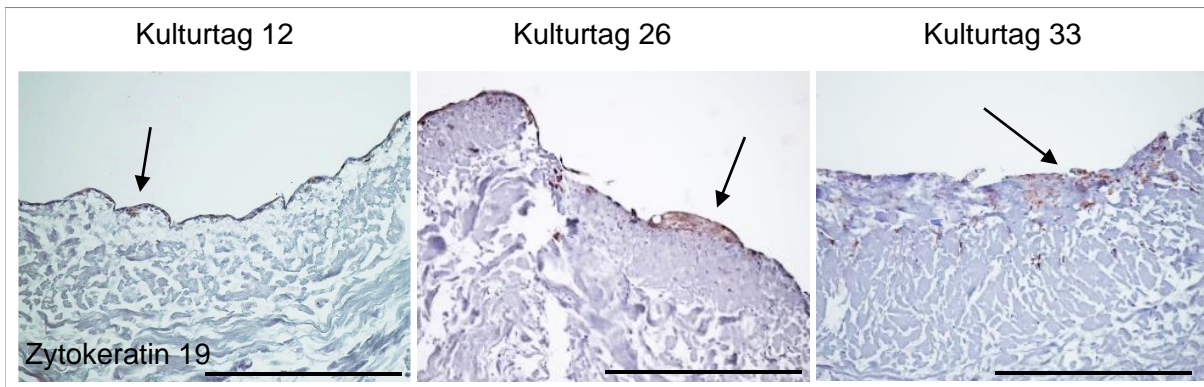
**Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung von Involucrin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Involucrin wurde als Marker für ausdifferenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen verwendet. Zytokeratin 13 war an Kulturtag 12 kräftig auf der Oberfläche des Mundschleimhaut-Äquivalents in einer durchgehenden Schicht nachweisbar. An Kulturtag 26 war die Zytokeratin 13-Schicht etwas breiter. An Kulturtag 33 war Zytokeratin 13 in Clustern in einem breiten Bereich auf dem Mundschleimhaut-Äquivalent verteilt (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 13 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

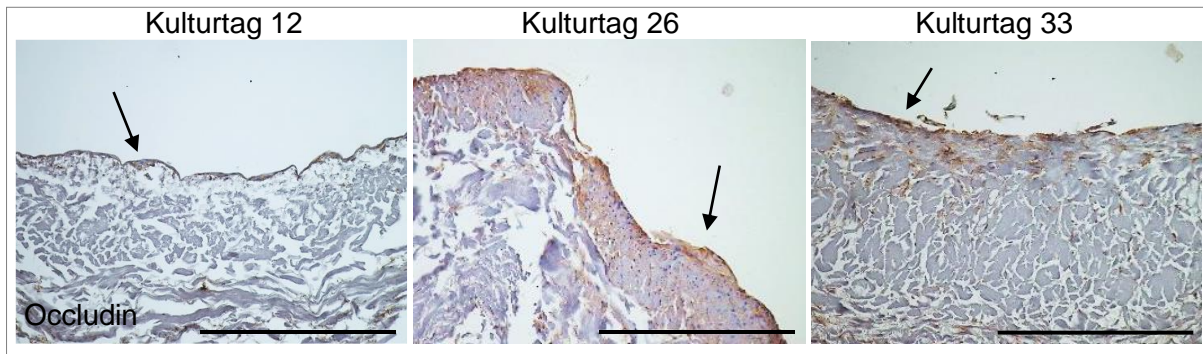
Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen verwendet. Es war an Kulturtag 12 nur schwach auf der Oberfläche des Mundschleimhaut-Äquivalents ausgeprägt. An Kulturtag 26 war Zytokeratin 19 deutlich ausgeprägter und in einer breiteren Schicht nachweisbar. An Kulturtag 33 war Zytokeratin 19 in Clustern in einem breiten Bereich im Mundschleimhaut-Äquivalent verteilt (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Die Expression von Occludin als Bestandteil von *Tight junctions* wurde als Marker für die Funktionalität der Epithelzellen verwendet. An Kulturtag 12 war Occludin nur schwach, an Kulturtag 26 und Kulturtag 33 stark in einer breiten Schicht auf der Oberfläche des Mundschleimhaut-Äquivalents ausgeprägt (Abbildung 24).

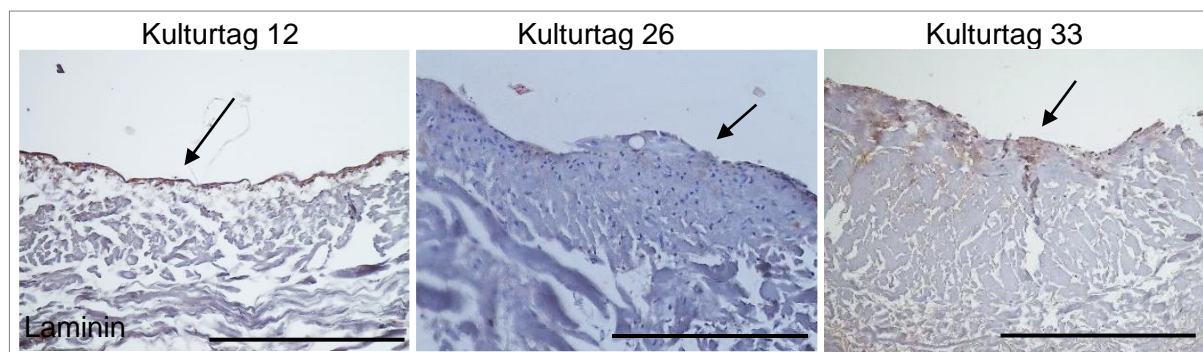




**Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Occludin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Occludin (Pfeile) wurde als Bestandteil von *Tight junctions* zur Analyse der Funktionalität der Epithelzellschichten verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

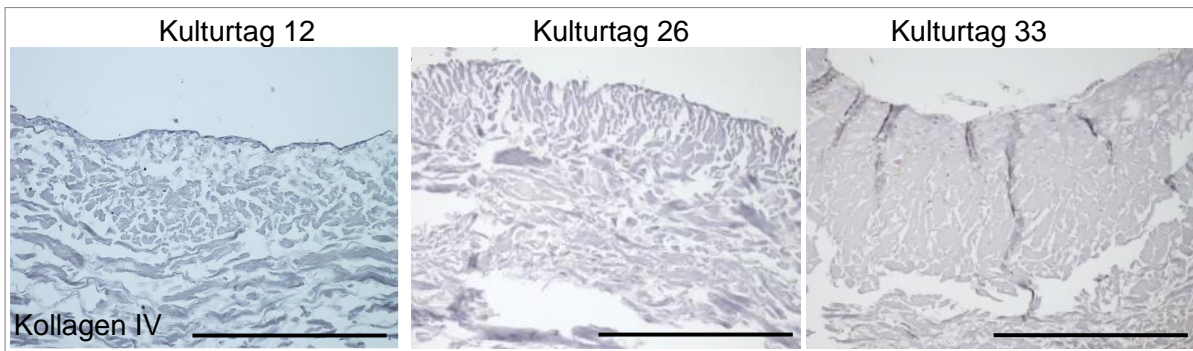
### 3.2.2.4 Basalmembranausbildung im Mundschleimhaut-Äquivalent

Die Ausbildung der Basalmembran im Mundschleimhaut-Äquivalent wurde mittels immunhistochemischer Färbung von Laminin und Kollagen IV untersucht. An Kulturtag 12 war eine oberflächliche Laminin-Schicht ausgeprägt. An Kulturtag 26 war die Laminin-Schicht etwas schwächer ausgeprägt, jedoch in einem breiteren Bereich verteilt als an Kulturtag 12. An Kulturtag 33 war Laminin in einem breiten Bereich im Mundschleimhaut-Äquivalent vorhanden (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung von Laminin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Laminin (Pfeile) wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Der Basalmembran-Bestandteil Kollagen IV konnte im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 12, 26, sowie 33 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.** Kollagen IV wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

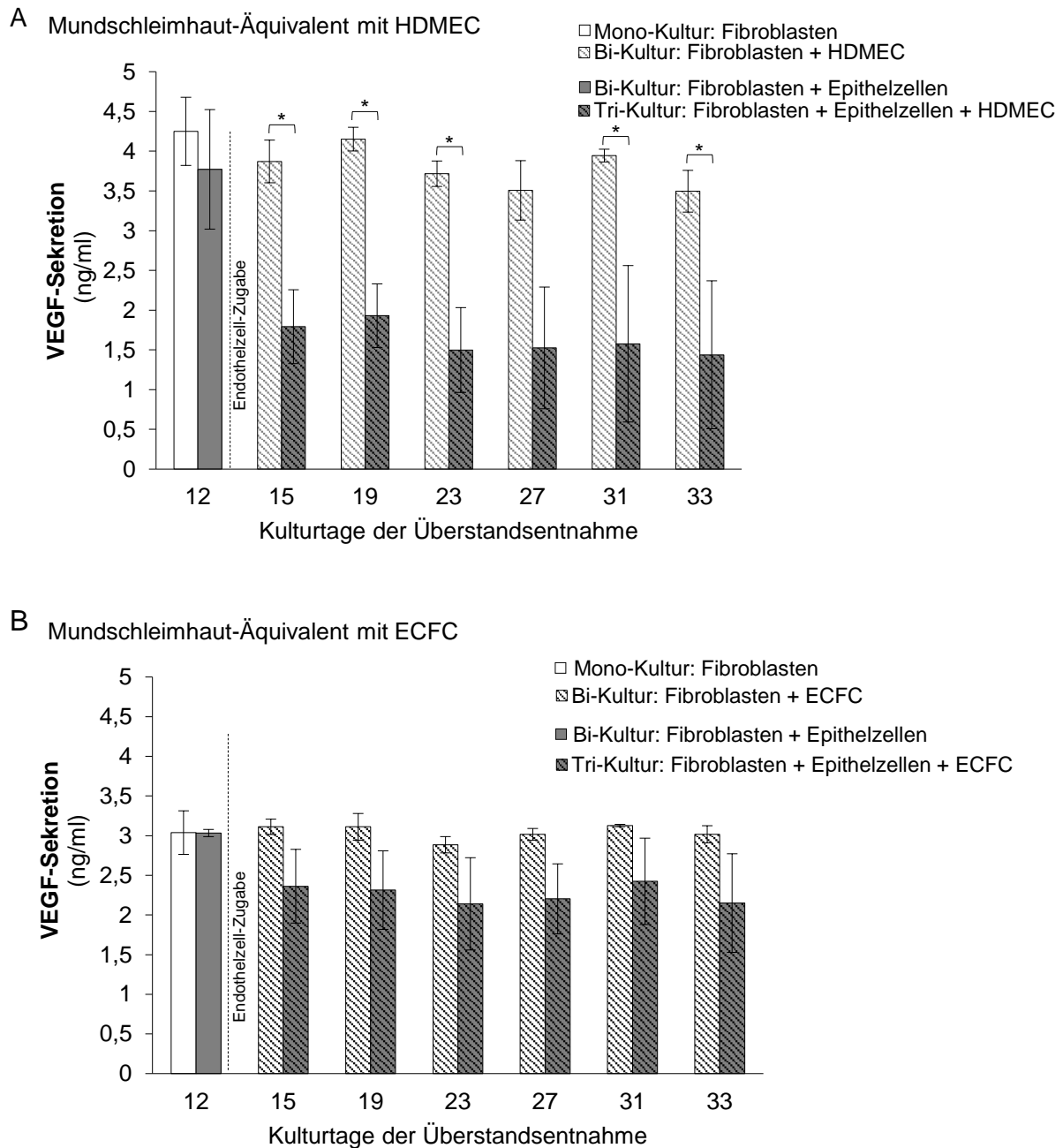
### 3.2.3 Parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents

Die parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents wurde im Hinblick auf die Sekretion verschiedener Zytokine untersucht. Zum einen wurde die Sekretion von Bi-Kulturen bestehend aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, sowie die Sekretion von Tri-Kulturen bestehend aus Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen auf der Kollagenmatrix analysiert. Zum anderen wurde die Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen jeweils mit ECFC anstelle von HDMEC untersucht. Die Analyse wurde von Kulturtag 12 bis Kulturtag 33 vorgenommen und gab die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Die Analyse der Sekretion an Kulturtag 12 bezog sich immer auf den Zeitpunkt vor dem Aussäen der Endothelzellen an diesem Kulturtag innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents. Deswegen ist bei der Analyse der Sekretion an Kulturtag 12 zum einen von einer Mono-Kultur mit Fibroblasten die Rede, welche nach der Zugabe der Endothelzellen zur Bi-Kultur (Analyse ab Kulturtag 15) wurde und zum anderen von einer Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen, die nach der Zugabe der Endothelzellen zur Tri-Kultur (Analyse ab Kulturtag 15) wurde.

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten an Kulturtag 12 vor der Zugabe der HDMEC sezernierte *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zu einer Mediumkonzentration von 4,2 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,8 ng/ml. Nach der Zugabe der HDMEC sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC an Kulturtag 15 VEGF

zu einer Mediumkonzentration von 3,8 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC zu einer Mediumkonzentration von 1,8 ng/ml. Die VEGF-Sekretion der Bi- und Tri-Kulturen blieb mit kleinen Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung konstant. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,5 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen zu einer Mediumkonzentration von 1,4 ng/ml. Ab Kulturtag 15 bis hin zu Kulturtag 33 (mit Ausnahme von Kulturtag 27) sezernierte die Tri-Kultur signifikant weniger VEGF als die Bi-Kultur (Abbildung 27 A).

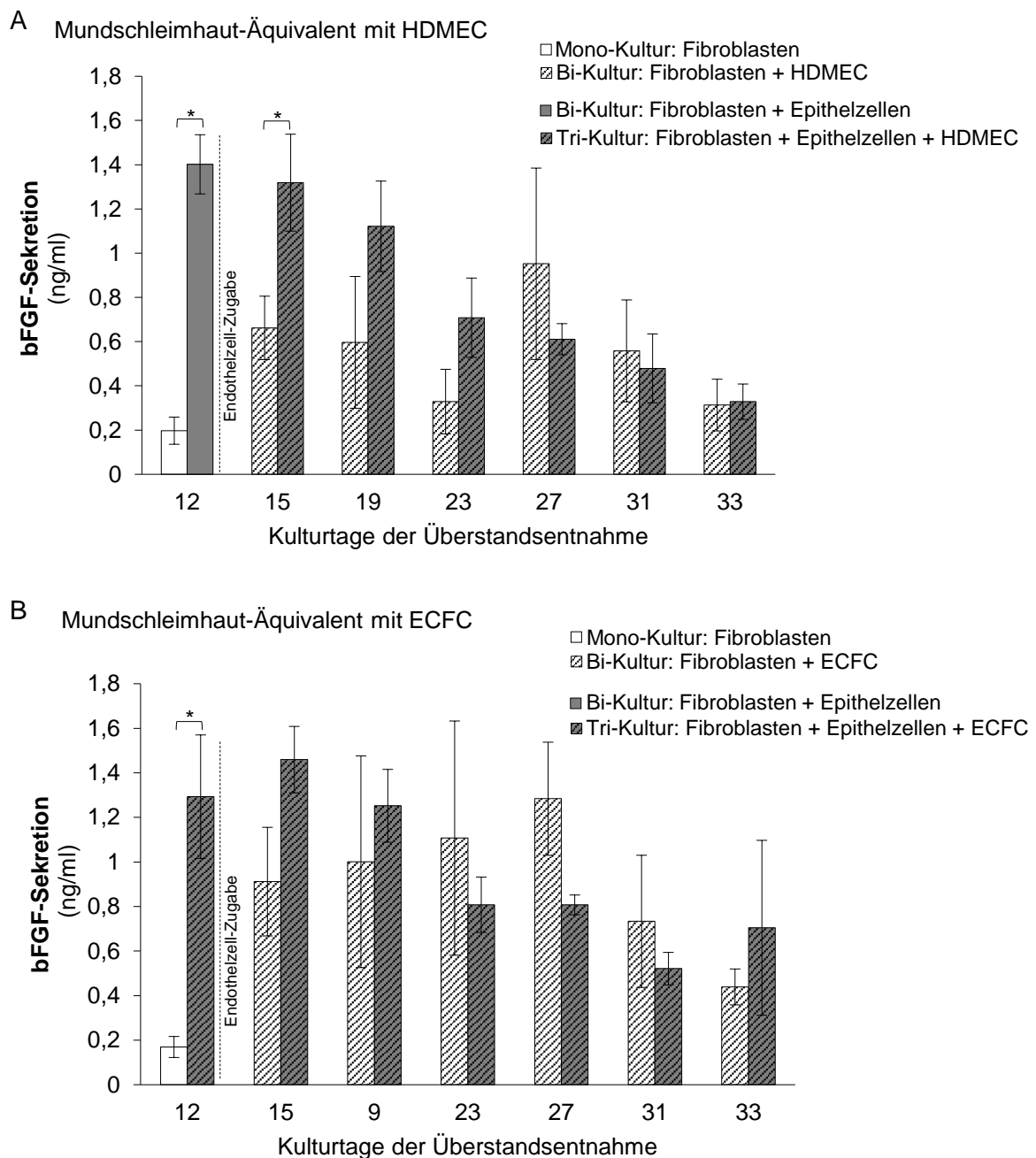
Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der ECFC VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,0 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,0 ng/ml. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,1 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC VEGF zu einer Mediumkonzentration von 2,4 ng/ml. Die VEGF-Sekretion dieser Bi- und Tri-Kulturen blieb mit kleinen Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung konstant. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur VEGF zu einer Mediumkonzentration von 3,0 ng/ml und die Tri-Kultur zu einer Mediumkonzentration von 2,1 ng/ml. (Abbildung 27 B).



**Abbildung 27: VEGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.** A) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. B) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände der Kulturen wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und gaben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurde mittels VEGF-ELISA analysiert. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der HDMEC *basic fibroblast growth factor* (bFGF) zu einer Mediumkonzentration von 0,2 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt bFGF zu einer Mediumkonzentration von 1,4 ng/ml und damit signifikant mehr als die Mono-Kultur. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC bFGF zu einer Mediumkonzentration von 0,7 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC 1,3 ng/ml bFGF und somit ebenfalls signifikant mehr als die Bi-Kultur an diesem Kulturtag. Die bFGF-Sekretion der Bi-Kultur schwankte (nicht-signifikant) bis zum Ende der Kultivierung und sank dann ab, so dass der Überstand am letzten Kulturtag 33 eine bFGF-Konzentration von 0,3 ng/ml hatte. Die Sekretion der Tri-Kultur sank nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 konstant ab. An Kulturtag 33 sezernierte die Tri-Kultur bFGF zu einer Mediumkonzentration von 0,3 ng/ml (Abbildung 28 A).

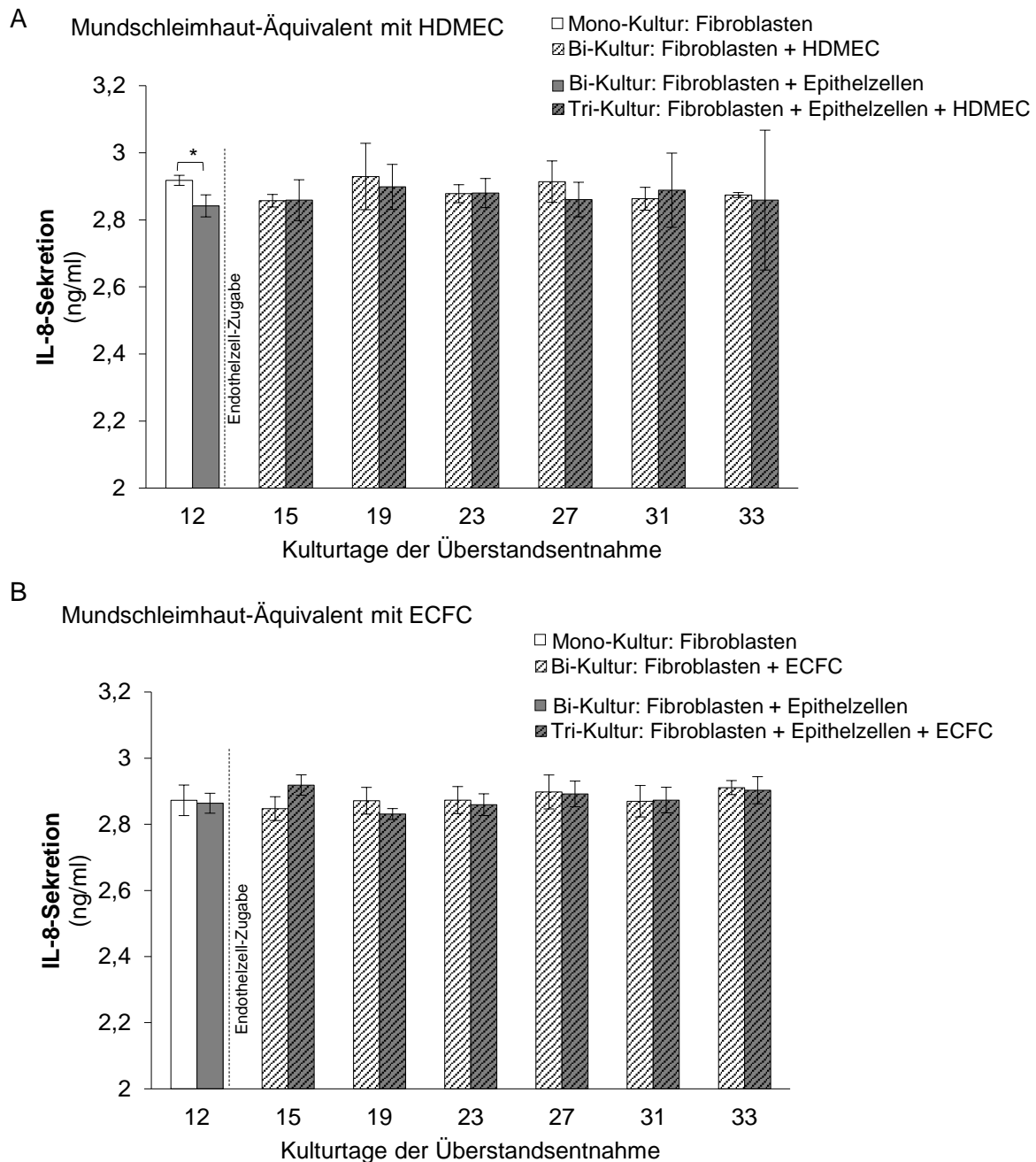
Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der ECFC bFGF zu einer Mediumkonzentration von 0,2 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt bFGF zu einer Mediumkonzentration von 1,3 ng/ml und damit signifikant mehr als die Mono-Kultur. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC bFGF zu einer Mediumkonzentration von 0,9 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC bFGF zu einer Mediumkonzentration von 1,5 ng/ml. Die bFGF-Sekretion der Bi-Kultur stieg bis Kulturtag 27 an, sodass der Überstand eine bFGF-Konzentration von 1,3 ng/ml erreichte und sank danach wieder bis zum Kulturende an Tag 33 ab, sodass der Überstand eine bFGF-Konzentration von 0,4 ng/ml hatte. Die bFGF-Sekretion der Tri-Kultur sank mit nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung an Tag 33 ab, so dass der Überstand eine bFGF-Konzentration von 0,7 ng/ml hatte (Abbildung 28 B).



**Abbildung 28: bFGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.** A) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. B) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände der Kulturen wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und gaben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurde mittels bFGF-ELISA analysiert. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der HDMEC Interleukin-8 (IL-8) zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,8 ng/ml und damit signifikant weniger als die Mono-Kultur. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC ebenfalls IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml. Die IL-8-Sekretion der Bi- und Tri-Kulturen blieb mit minimalen nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur sowie die Tri-Kultur IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml (Abbildung 29 A).

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der ECFC IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt IL-8 ebenfalls zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,8 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml. Die IL-8-Sekretion der Bi- und Tri-Kulturen blieb mit minimalen nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur sowie die Tri-Kultur IL-8 zu einer Mediumkonzentration von 2,9 ng/ml (Abbildung 29 B).

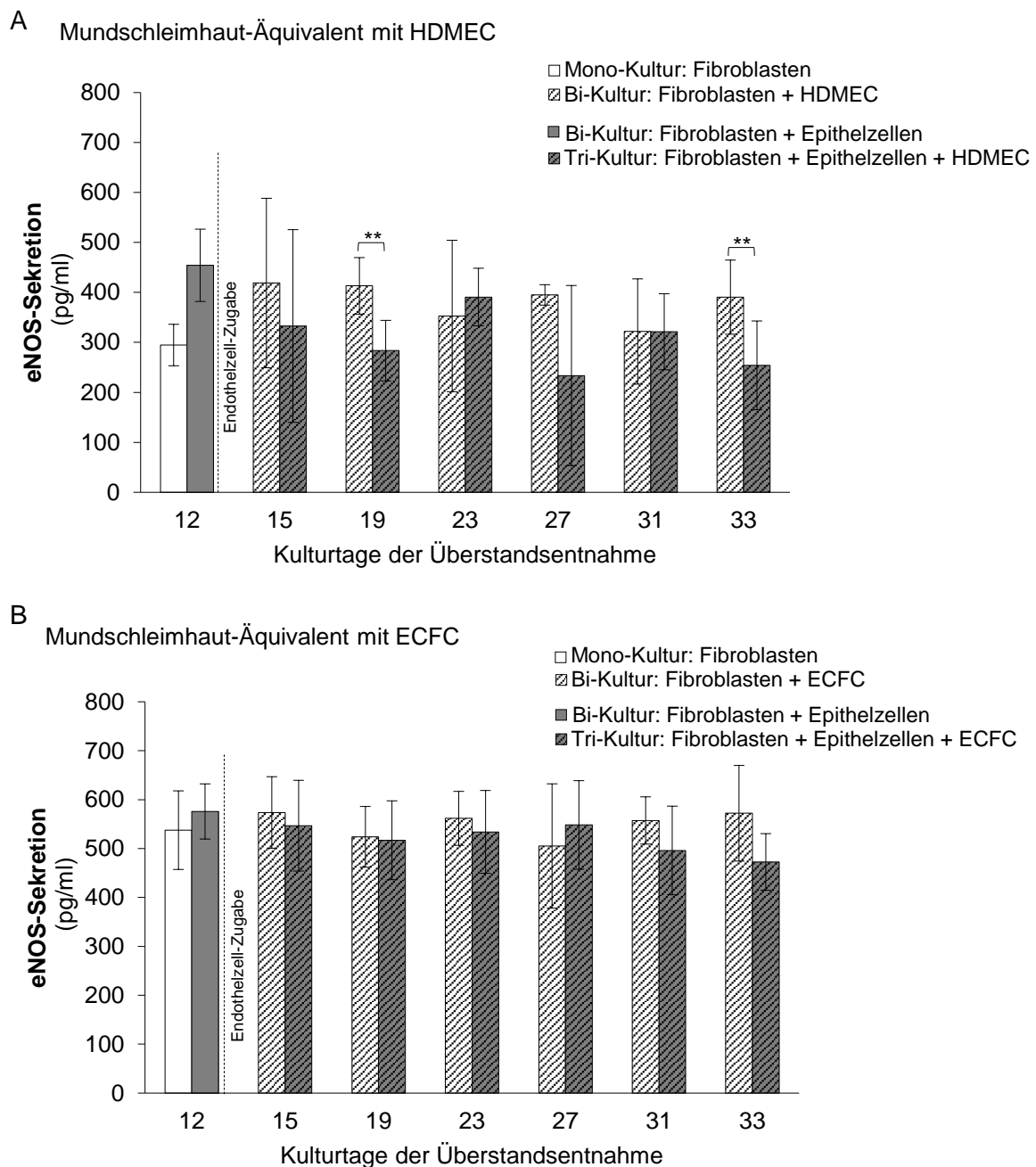


**Abbildung 29: IL-8-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.** A) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. B) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände der Kulturen wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und gaben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurde mittels IL-8-ELISA analysiert. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.



Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der HDMEC endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu einer Mediumkonzentration von 295 pg/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt eNOS zu einer Mediumkonzentration von 454 pg/ml. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC eNOS zu einer Mediumkonzentration von 418 pg/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC zu einer Mediumkonzentration von 333 pg/ml. Die eNOS-Sekretion der Bi- und Tri-Kulturen blieb mit nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur eNOS zu einer Mediumkonzentration von 391 pg/ml und die Tri-Kultur zu einer Mediumkonzentration von 254 pg/ml. An Kulturtag 19 und Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC signifikant mehr eNOS als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC (Abbildung 30 A).

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der ECFC eNOS zu einer Mediumkonzentration von 538 pg/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt eNOS zu einer Mediumkonzentration von 576 pg/ml. Die eNOS-Sekretion der Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC und die der Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC blieb mit minimalen nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur eNOS zu einer Mediumkonzentration von 572 pg/ml und die Tri-Kultur zu einer Mediumkonzentration von 473 pg/ml (Abbildung 30 B).

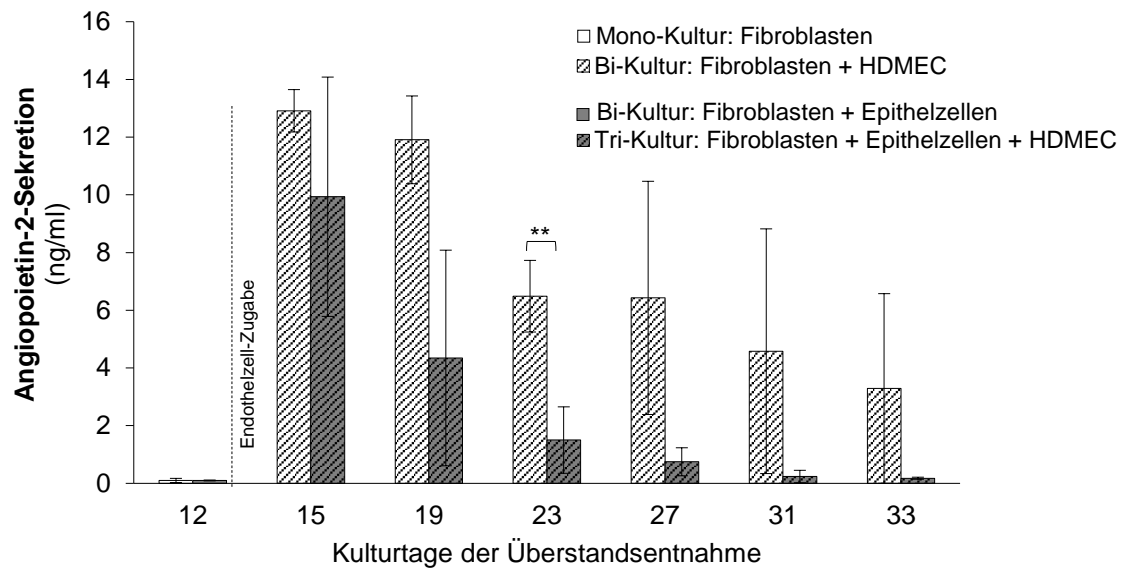


**Abbildung 30: eNOS-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.** A) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. B) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände der Kulturen wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und gaben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurde mittels eNOS-ELISA analysiert. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

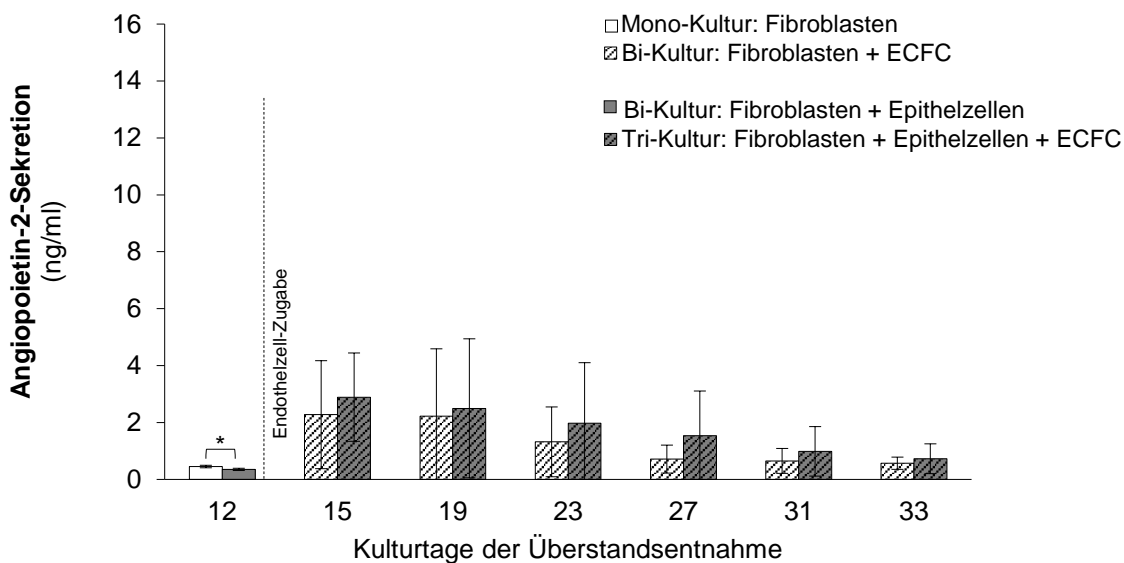
Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der HDMEC Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,1 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,1 ng/ml. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 12,9 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC zu einer Mediumkonzentration von 9,9 ng/ml. Die Angiotensin-2-Sekretion der Bi-Kultur sank bis zum Ende der Kultivierung konstant ab. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 3,3 ng/ml. Auch die Sekretion der Tri-Kultur sank nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 konstant ab. An Kulturtag 33 sezernierte die Tri-Kultur Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,18 ng/ml. An Kulturtag 23 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC signifikant mehr Angiotensin-2 als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC (Abbildung 31 A).

Die Mono-Kultur mit Fibroblasten sezernierte an Kulturtag 12 vor der Zugabe der ECFC Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,45 ng/ml. Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierte zu diesem Zeitpunkt Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,35 ng/ml und damit signifikant weniger als die Mono-Kultur. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 2,27 ng/ml und die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC zu einer Mediumkonzentration von 2,89 ng/ml. Die Angiotensin-2-Sekretion der Bi-Kultur sank bis zum Ende der Kultivierung konstant ab. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,57 ng/ml. Auch die Sekretion der Tri-Kultur sank nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 konstant ab. An Kulturtag 33 sezernierte die Tri-Kultur Angiotensin-2 zu einer Mediumkonzentration von 0,73 ng/ml (Abbildung 31 B).

## A Mundschleimhaut-Äquivalent mit HDMEC

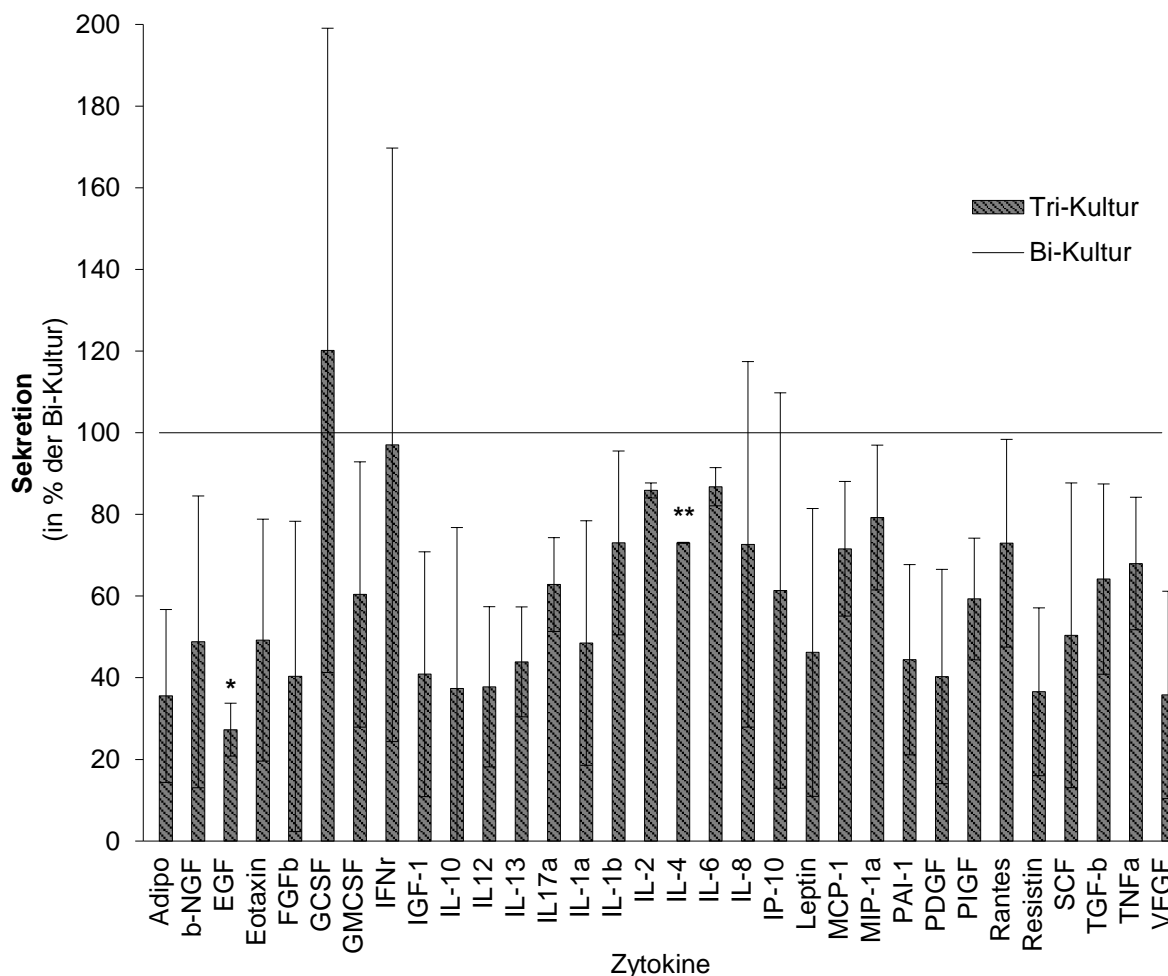


## B Mundschleimhaut-Äquivalent mit ECFC

**Abbildung 31: Angiopoietin-2-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.**

A) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. B) Die Bi-Kultur bestand aus Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kultur beinhaltete zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände der Kulturen wurden an Kulturtag 12, 15, 19, 23, 27, 31 und 33 entnommen und gaben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurde mittels Angiopoietin-2-ELISA analysiert. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Eine Breitbandanalyse der Sekretion von 32 Zytokinen von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen an Kulturtag 33 wurde zusätzlich durchgeführt. Auch hier gab die Analyse die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Es zeigte sich, dass ein Großteil der untersuchten Zytokine von der Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen deutlich geringer sezerniert wurde als von der Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC. Die Sekretion von EGF und IL-4 war bei der Tri-Kultur signifikant niedriger als bei der Bi-Kultur (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Sekretion verschiedener Zytokine von Bi- und Tri-Kulturen an Kulturtag 33.** Die Bi-Kulturen bestanden aus Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix, die Tri-Kulturen beinhalteten zusätzlich Epithelzellen. Die Überstände wurden an Kulturtag 33 entnommen und geben die Sekretion der jeweils letzten 24 h wieder. Diese wurden mittels *Human Cytokine ELISA Plate Array I* analysiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus zwei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Die Bi-Kultur wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert und beziehen sich auf Bi-Kultur.

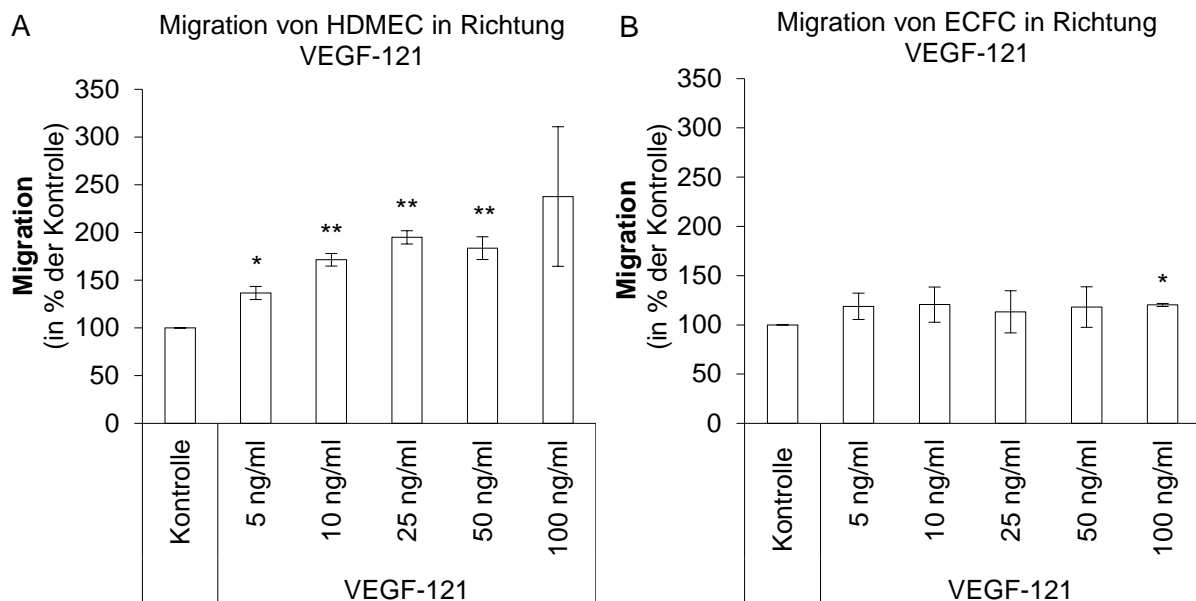
### 3.3 Optimierung der Prävascularisation mittels chemotaktischer Verfahren

Die Prävascularisierung der Mundschleimhaut-Äquivalente durch mikrovaskuläre Endothelzellen wurde erfolgreich und reproduzierbar in den oberflächlichen Bereich der porösen Seite der Kollagenmatrix erzeugt. Für die Versorgung des Epithels der Mundschleimhaut-Äquivalente bei *in vivo*-Anwendungen wäre eine tiefgehende Prävascularisierung von Vorteil. Um die Endothelzellen und somit die Ausbildung von Gefäßstrukturen in tieferen Bereichen der Kollagenmatrix anzusiedeln, wurden verschiedene chemotaktische Verfahren angewendet, durch die die Zellmigration angeregt werden sollte.

#### 3.3.1 Analyse von VEGF-121 als Chemotaxin für Endothelzellen

Für die verschiedenen chemotaktischen Verfahren wurde zunächst VEGF-121 als Lockstoff in verschiedenen Konzentrationen zur Endothelzell-Migration ausgetestet.

Die Migration von HDMEC in Richtung VEGF-121 war bei einer Konzentration von 5 ng/ml bis hin zu einer Konzentration von 50 ng/ml VEGF-121 im Vergleich zur Kontrolle ohne Lockstoff signifikant erhöht. Am stärksten migrierten HDMEC bei einer VEGF-121-Konzentration von 25 ng/ml. Damit war die Migration im Vergleich zur Kontrolle um das Doppelte (195 %) erhöht (Abbildung 33 A). Die Migration von ECFC in Richtung VEGF-121 war bei einer Konzentration von 100 ng/ml VEGF-121 auf 120 % erhöht (Abbildung 33 B).



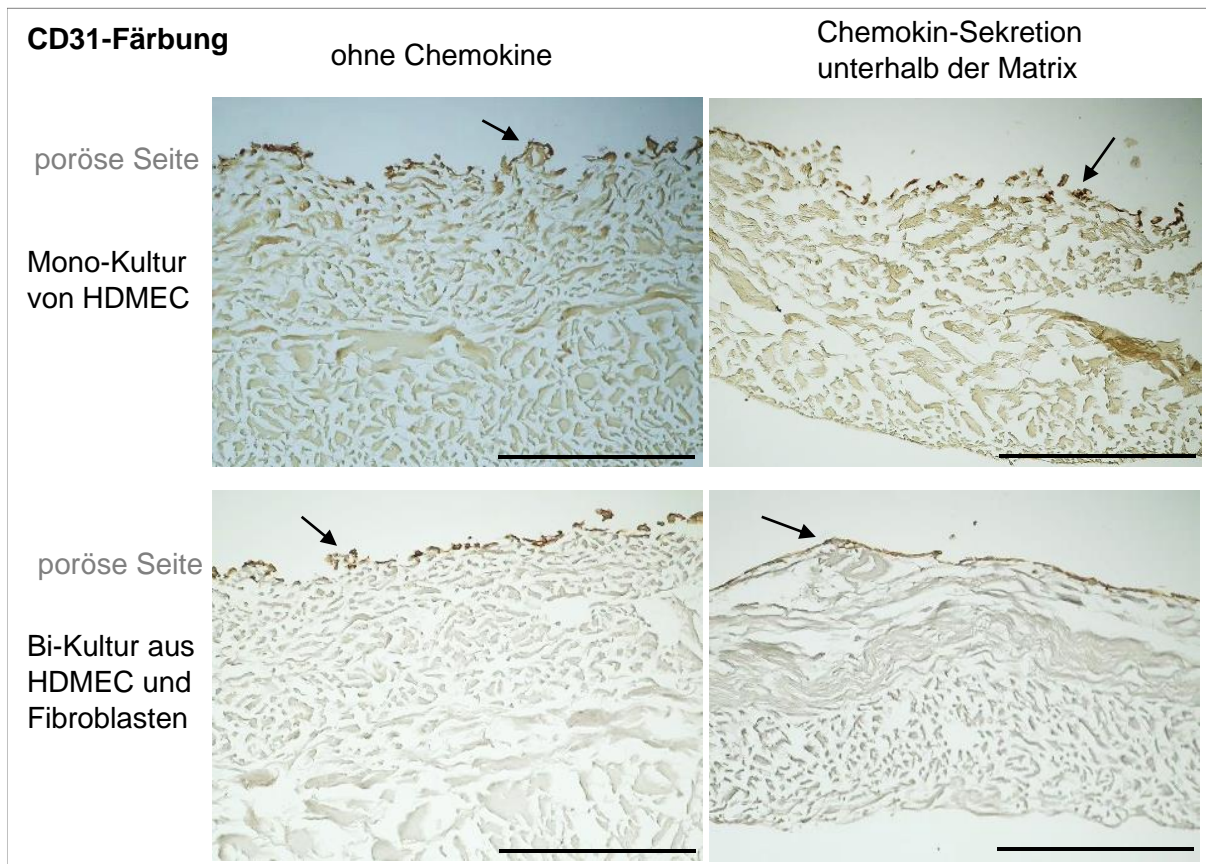
**Abbildung 33: Chemotaktische Migration von HDMEC und ECFC in Richtung VEGF-121 in verschiedenen Konzentrationen.** A) Die Migration von HDMEC in Richtung VEGF-121 in serumfreiem Medium in den Konzentrationen 5 - 100 ng/ml wurde mittels Boyden-Kammer-Migrationsassay analysiert. Als Kontrolle wurde serumfreies Medium ohne VEGF-121 als Lockstoff verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen in Bezug auf die Kontrolle, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert und beziehen sich auf die Kontrolle. B) Die Migration von ECFC in Richtung VEGF-121 in serumfreiem Medium in den Konzentrationen 5-100 ng/ml wurde ebenfalls mittels Boyden-Kammer-Migrationsassay analysiert. Als Kontrolle wurde serumfreies Medium ohne VEGF-121 als Lockstoff verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus zwei Durchgängen in Bezug auf die Kontrolle, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert und beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle.

Für die verschiedenen chemotaktischen Verfahren zur Anregung der Endothelzellmigration wurde VEGF-121 in einer Konzentration von 25 ng/ml, sowie 100 ng/ml VEGF-121 verwendet.

### 3.3.2 Migration von HDMEC durch Chemokin-Sekretion von Fibroblasten

Es wurde versucht die Migration von HDMEC auf der Kollagenmatrix mittels Chemokin-Sekretion durch Fibroblasten anzuregen. Hierfür wurden Mono-Kulturen von HDMEC, sowie Bi-Kulturen aus HDMEC und Fibroblasten auf Kollagenmatrices in einem Transwell-System ausgesät. Unterhalb des Transwells wurden Fibroblasten zur Chemokin-Sekretion ausgesät. Die Chemokin-Sekretion der Fibroblasten unterhalb der besiedelten Matrix im Transwell-System führte weder bei der Mono-Kultur mit

HDMEC noch bei der Bi-Kultur mit HDMEC und Fibroblasten zur Migration der Endothelzellen in tiefere Bereiche der Kollagenmatrix (Abbildung 34).



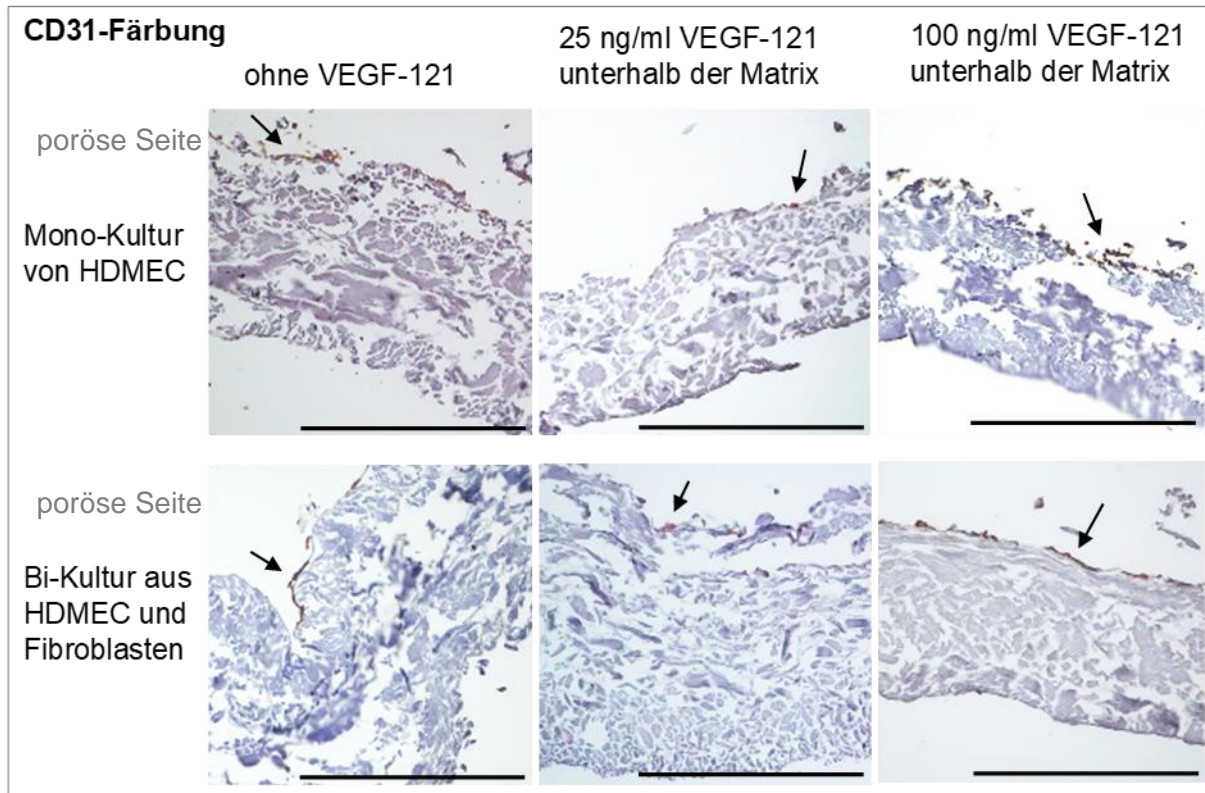
**Abbildung 34: HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz unterhalb der Matrix vermittelt über Chemokin-Sekretion von Fibroblasten.** Die Kollagenmatrices wurden mit einer Mono-Kultur von HDMEC, sowie einer Bi-Kultur aus HDMEC und Fibroblasten in einem Transwell-System besiedelt. Das Well wurde mit Chemokin-sezernierenden Fibroblasten besiedelt. Nach 24 h erfolgte die Fixierung und anschließend eine immunhistochemische CD31-Färbung (Pfeile) der besiedelten Kollagenmatrices. Die abgebildeten Matrices sind mit der porösen Seite nach oben und der glatten, zelloklusiven Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3. Migration von HDMEC durch definierte VEGF-121-Konzentration

Es wurde versucht die Migration von HDMEC auf der Kollagenmatrix durch definierte VEGF-121-Konzentrationen zu vermitteln. Hierfür wurden Mono-Kulturen von HDMEC, sowie Bi-Kulturen aus HDMEC und Fibroblasten auf Kollagenmatrices in einem Transwell-System ausgesät. Unterhalb des *Inserts* wurde VEGF-121 in einer Konzentration von 25 ng/ml oder 100 ng/ml in HDMEC-Medium gegeben. HDMEC-Medium ohne VEGF-121 diente als Negativkontrolle. Weder der Einsatz von 25 ng/ml VEGF-121 noch der von 100 ng/ml VEGF-121 unterhalb der besiedelten Matrix im Transwell-System führte bei der Mono-Kultur mit HDMEC oder bei der Bi-Kultur mit



HDMEC und Fibroblasten zur Migration der Endothelzellen in tiefere Bereiche der Kollagenmatrix im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 35).



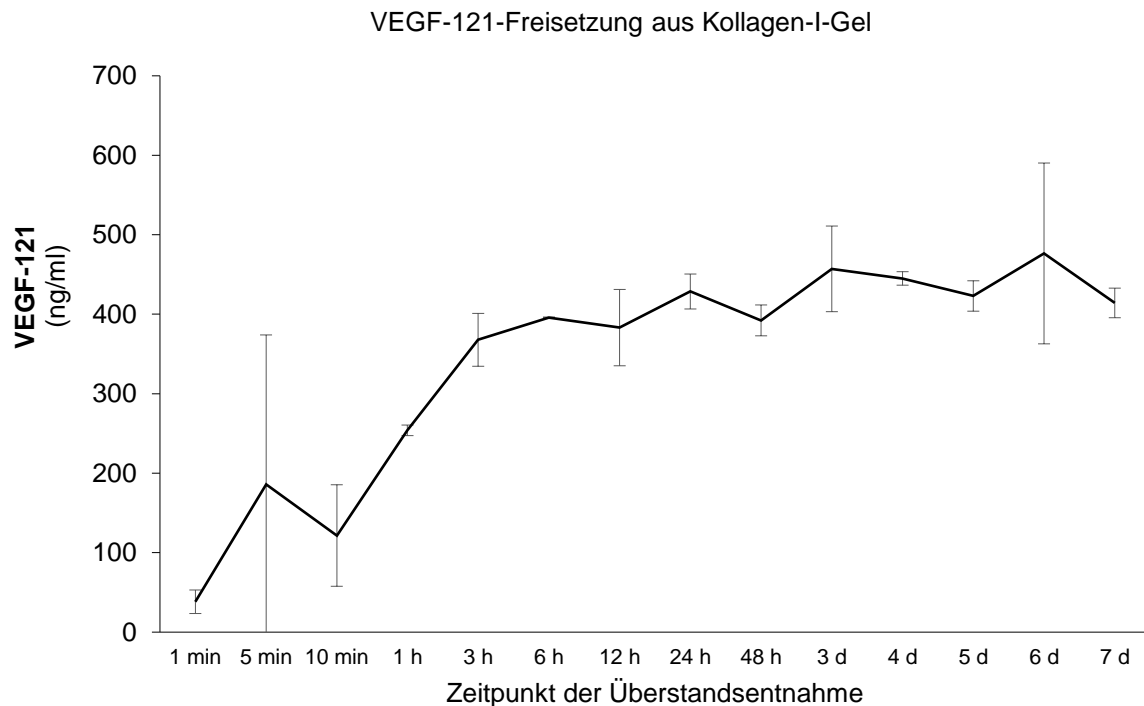
**Abbildung 35: HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz unterhalb der Matrix vermittelt über VEGF-121.** Die Kollagenmatrices wurden mit einer Mono-Kultur von HDMEC, sowie einer Bi-Kultur aus HDMEC und Fibroblasten in einem Transwell-System besiedelt. In das Well wurde VEGF-121 in einer Konzentration von 25 ng/ml oder 100 ng/ml in HDMEC-Medium gegeben. Nach 24 h erfolgte die Fixierung und anschließend eine immunhistochemische CD31-Färbung (Pfeile) der Kollagenmatrices. Die abgebildeten Matrices sind mit der porösen Seite nach oben und der glatten, zelloklusiven Matrixseite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.4 Migration von HDMEC durch VEGF-121-versetztes Gel

Des Weiteren wurde versucht die Endothelzellmigration auf der Kollagenmatrix mithilfe eines mit VEGF-121 versetzten Kollagen I-Gels zu bewirken. Hierfür wurde ein Kollagen I-Gel mit 1  $\mu\text{g/ml}$  VEGF-121 versetzt. Auf das auspolymerisierte Gel sollte die besiedelte Kollagenmatrix mit der Endothelzell-besiedelten Seite nach oben gerichtet gelegt werden, so dass das vom Gel mit der Zeit freiwerdendes VEGF-121 eine Zellmigration über die Zeit anregt.

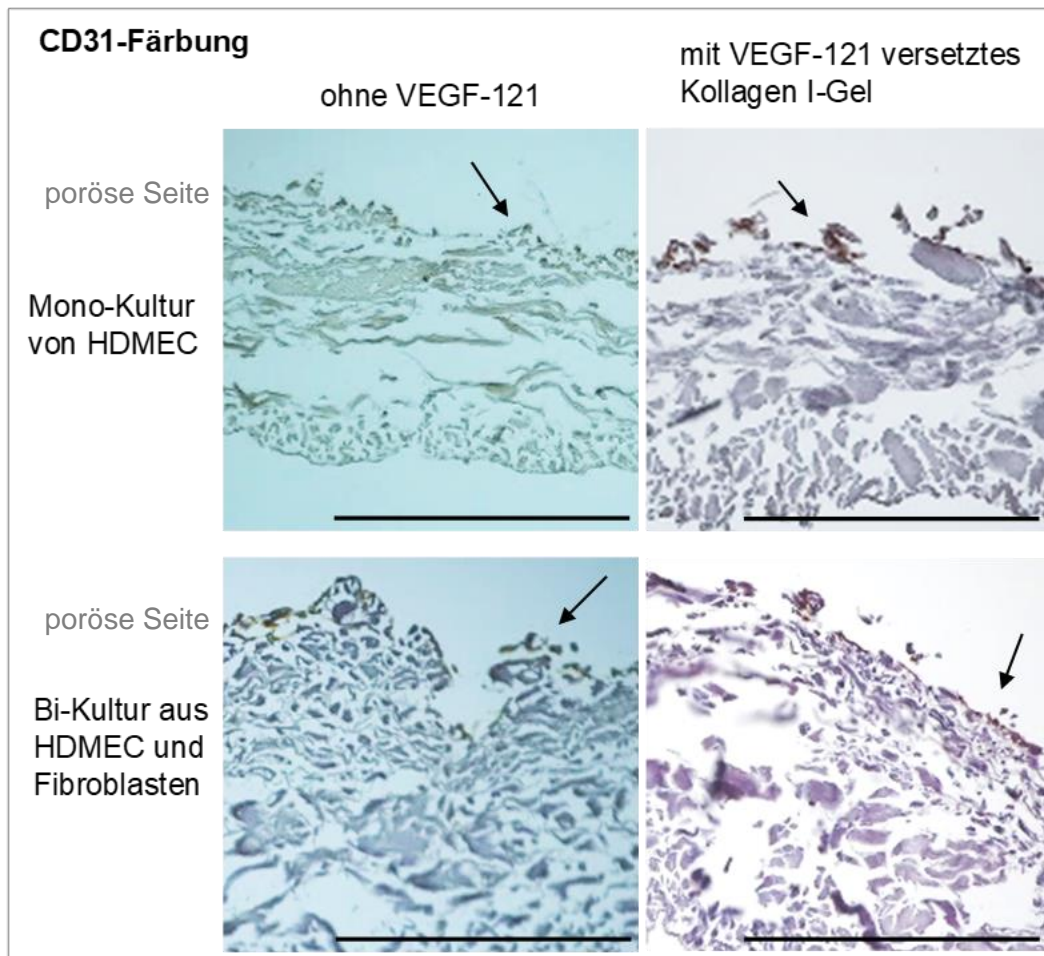
Um die VEGF-121-Freisetzung des Kollagen I-Gels nachzuweisen, wurde das Gel als Vorversuch mit DPBS als Überstand beschichtet und das DPBS zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 min und 7 d auf abgegebenes VEGF-121 untersucht. Es zeigte

sich, dass das Kollagen I-Gel über die Zeit das VEGF-121 abgab. Nach 3 h war VEGF zu einer Konzentration von 368 ng/ml in das darüber liegende DPBS abgegeben worden. Mit leichten Schwankungen stieg die VEGF-121-Abgabe des Gels zu einer VEGF-Konzentration von 414 ng/ml in dem darüberliegenden DPBS nach 7 d an (Abbildung 36). Somit konnte eine erfolgreiche Abgabe von VEGF-121 für den Versuch des chemotaktischen Verfahrens mithilfe des Kollagen I-Gels gezeigt werden.



**Abbildung 36: VEGF-121-Freisetzung aus Kollagen I-Gel in darüber liegendes DPBS innerhalb von 7 Tagen.** Das Kollagen I-Gel wurde mit 1 µg/ml VEGF-121 versetzt und nach dem Auspolymerisieren mit DPBS bedeckt. Nach verschiedenen Zeitpunkten von 1 min bis hin zu 7 d, wurde der Überstand entnommen und mittels ELISA auf VEGF-121 analysiert. Gezeigt sind die gemittelten Werte aus zwei Durchführungen mit Triplet-Ansätzen, sowie die Standardabweichungen.

Für den chemotaktischen Ansatz mithilfe des VEGF-121-versetzten Kollagen I-Gels wurden Kollagenmatrices mit Mono-Kulturen von HDMEC, sowie Bi-Kulturen aus HDMEC und Fibroblasten besiedelt. Die besiedelten Matrices wurden auf das Kollagen I-Gel gelegt und mit HDMEC-Medium bedeckt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit einem Kollagen I-Gel ohne zugesetzten VEGF-121. Es zeigte sich weder bei der Mono-Kultur noch bei der Bi-Kultur eine Migration in tiefere Bereiche der Matrix (Abbildung 37).



**Abbildung 37: HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz vermittelt über mit VEGF-121 versetztes Kollagen I-Gel unterhalb der Kollagenmatrix.** Die Kollagenmatrices wurden mit einer Mono-Kultur von HDMEC, sowie einer Bi-Kultur aus HDMEC und Fibroblasten besiedelt. Die besiedelte Matrix wurde auf ein mit 1 µg/ml VEGF-121 versetztes Kollagen I-Gel gelegt. Nach 24 h erfolgte die Fixierung und anschließend eine immunhistochemische CD31-Färbung (Pfeile) der Kollagenmatrices. Die abgebildeten besiedelten Matrices sind mit der porösen Seite nach oben und der glatten, zelloklusiven Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

### 3.3.5 VEGF-121-beladenen Nanopartikel als chemotaktische Quelle

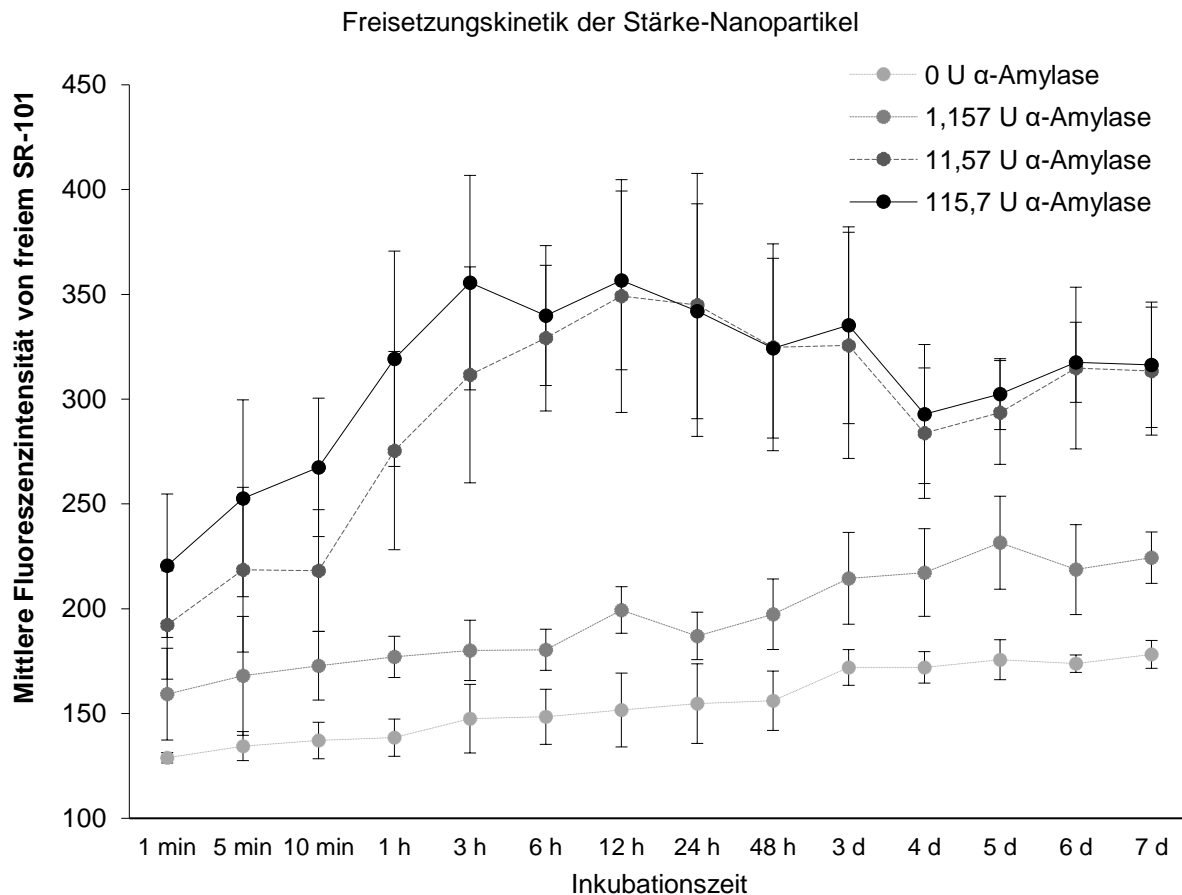
Ein weiterer Ansatz, um die Migration von Endothelzellen in tiefere Bereiche des Mundschleimhaut-Äquivalents anzuregen, war es, einen konstanten chemotaktischen Gradienten von VEGF-121 mittels Nanopartikeln herzustellen. Hierfür wurden zum einen Nanopartikel aus Stärke und zum anderen aus Hydroxyethylstärke (HES) mit eingekapseltem VEGF-121 hergestellt. Die Nanopartikel sollten nach erfolgreichen Vorversuchen kovalent und nicht-kovalent an die glatte, Seite des Mundschleimhaut-Äquivalents gebunden werden. Der Abbau der Nanopartikel erfolgt durch die Zugabe von  $\alpha$ -Amylase und soll eine kontrollierte Freisetzung ermöglichen. Da die

Abbaugeschwindigkeit von Stärke mit  $\alpha$ -Amylase hauptsächlich durch Hydroxyethylierung bestimmt wird, sollte die langfristige Freisetzung durch Verwendung von Stärken mit einem variablen Hydroxyethylierungsgrad kontrolliert werden. In der Theorie sollten die Stärke-Nanopartikel früher auf als die HES-Nanopartikel brechen. Dadurch sollte die Freisetzung eines längerfristigen, konstanten VEGF-121-Gradienten erzeugt werden, der die Endothelzellen zur Migration in Richtung der Epithelschicht des Mundschleimhaut-Äquivalents anregt.

#### 3.3.5.1 Freisetzungskinetik der Nanopartikel

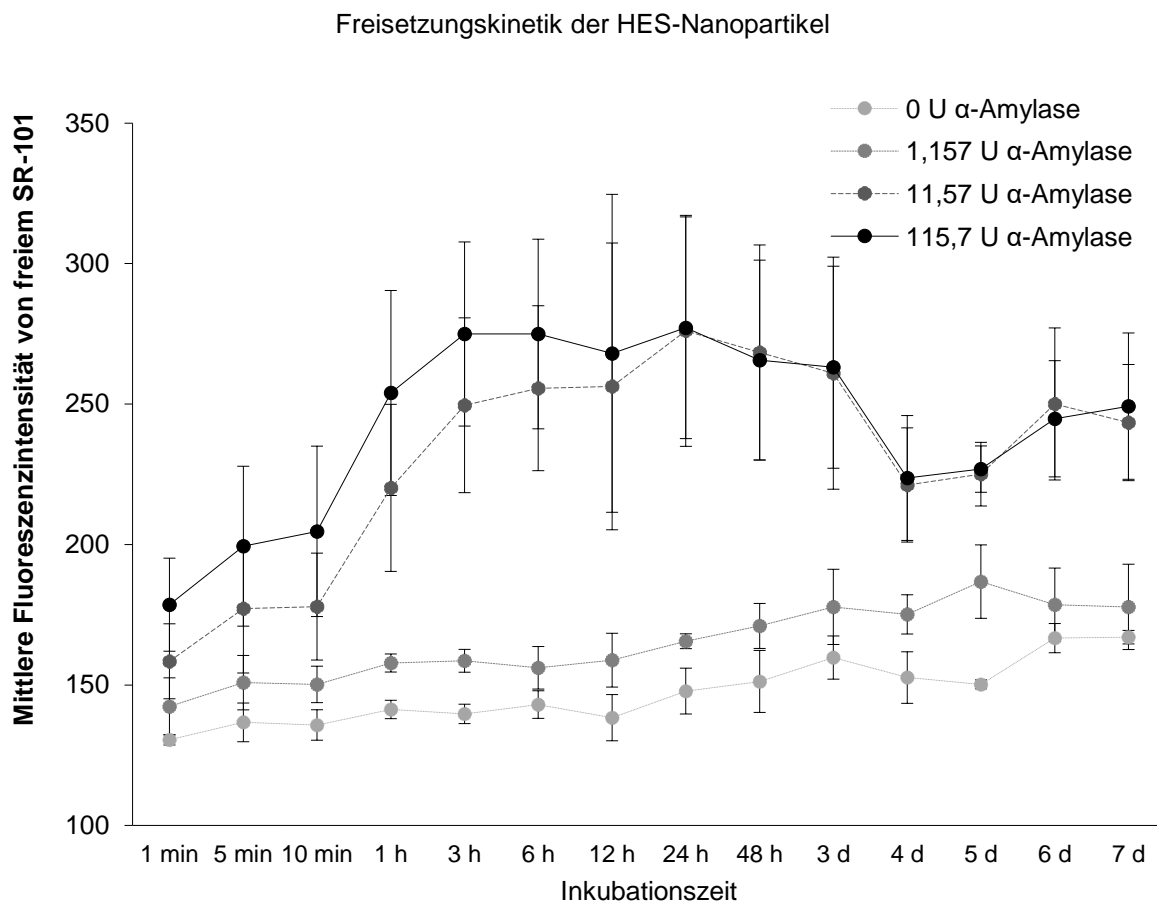
Die Freisetzungskinetik der Stärke- sowie HES-Nanopartikel wurde mittels Sulforhodamin-101 (SR-101)-Freisetzung nach  $\alpha$ -Amylase-Behandlung ermittelt. Hierfür wurden die Nanopartikel bis hin zu 7 Tage mit 1,157 U, 11,57 U, oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase behandelt. Daraufhin wurde die Fluoreszenzintensität des freiwerdenden Fluoreszenzfarbstoffes SR-101 gemessen.

Die Behandlung der Stärke-Nanopartikel mit 1,157 U  $\alpha$ -Amylase führte zu einer geringen Freisetzung von SR-101 über 7 Tage hinweg. Eine deutlich höhere Freisetzung von SR-101 wurde durch 11,57 U und 115,7 U  $\alpha$ -Amylase erreicht. Die maximale Freisetzung war mit 11,57 U  $\alpha$ -Amylase nach 12 h erreicht. Bei der Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, war die maximale Freisetzung bereits nach 3 h erreicht (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die Stärke-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 1,157 U, 11,57 U, oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase behandelt. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des freigewordenen SR-101 gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen.

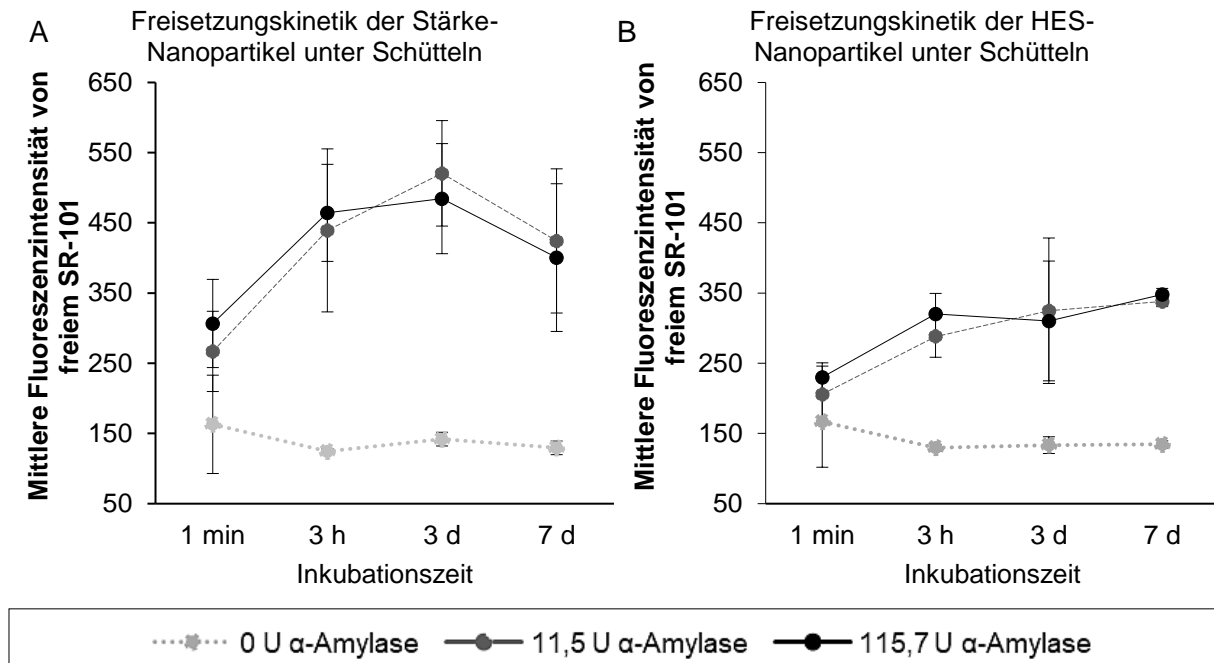
Die Behandlung der HES-Nanopartikel mit 1,157 U  $\alpha$ -Amylase führte ebenfalls zu einer geringen Freisetzung von SR-101 über 7 Tage hinweg. Eine deutlich höhere Freisetzung von SR-101 wurde durch 11,57 U und 115,7 U  $\alpha$ -Amylase erreicht. Die maximale Freisetzung war mit 11,57 U  $\alpha$ -Amylase nach 24 h erreicht. Bei der Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, war die maximale Freisetzung bereits nach 3 h erreicht (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die HES-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 1,157 U, 11,57 U, oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase behandelt. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des freigewordenen SR-101 gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen.

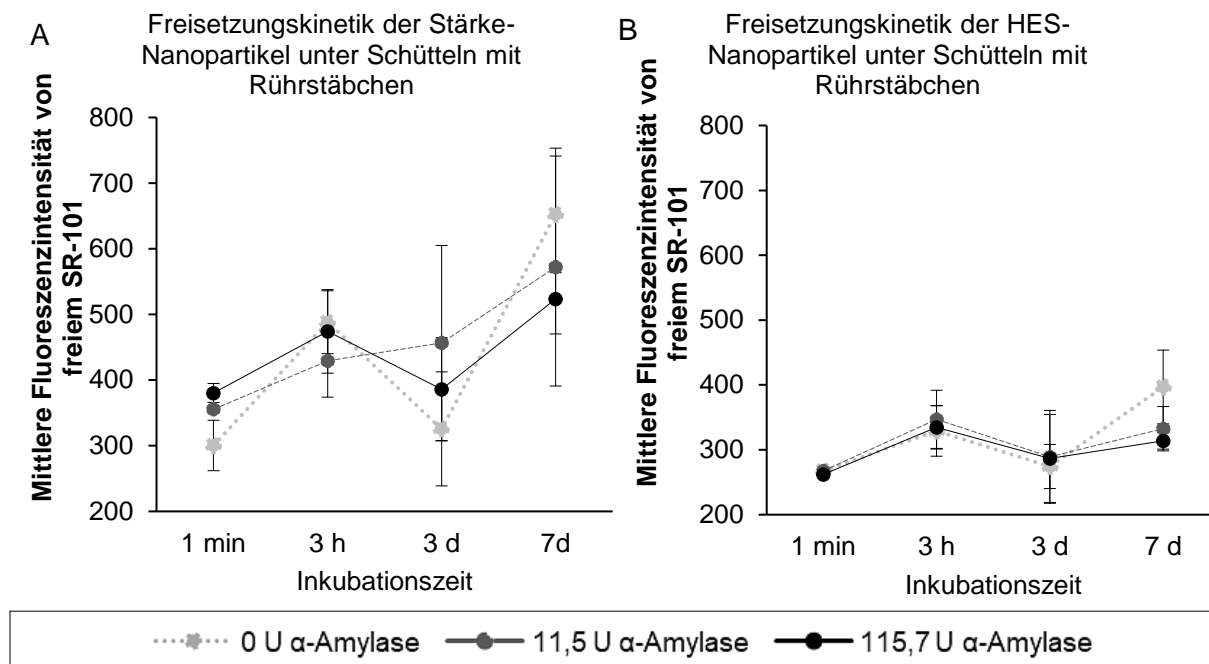
In einem weiteren Versuch wurden die Nanopartikel mittels  $\alpha$ -Amylase unter dauerhaftem Schütteln über 7 Tage hinweg behandelt und aufgebrochen. Die Stärke- sowie HES-Nanopartikel mit eingekapseltem SR-101 wurden unter Schütteln mit 0 U, 11,57 U, oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase behandelt.

Die maximale Freisetzung von SR-101 war bei der Behandlung der Stärke-Nanopartikel mit 11,57 U  $\alpha$ -Amylase nach 3 d erreicht. Bei der Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, war die maximale Freisetzung von SRS-101 aus den Stärke-Nanopartikeln ebenfalls nach 3 d erreicht (Abbildung 40 A). Die maximale Freisetzung von SR-101 war bei der Behandlung der HES-Nanopartikel mit 11,57 U  $\alpha$ -Amylase nach 3 d erreicht. Bei der Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, war die maximale Freisetzung von SRS-101 aus den Stärke-Nanopartikeln nach 3 h erreicht (Abbildung 40 B).



**Abbildung 40: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) α-Amylase unter Schütteln nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.** A) Die Stärke-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 11,57 U, oder 115,7 U α-Amylase unter Schütteln behandelt. B) Die HES-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 11,57 U, oder 115,7 U α-Amylase unter Schütteln behandelt. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des freigewordenen SR-101 gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus vier Durchgängen, sowie die Standardabweichungen.

In einem weiteren Versuch wurden die Nanopartikel mittels α-Amylase unter dauerhaftem Schütteln mit Rührstäbchen über 7 Tage hinweg behandelt und aufgebrochen. Die Stärke- sowie HES-Nanopartikel mit eingekapseltem SR-101 wurden unter Schütteln mit Rührstäbchen mittels 11,57 U oder 115,7 U α-Amylase aufgebrochen. Die Behandlung der Stärke- sowie der HES-Nanopartikel mit 11,57 U oder 115,7 U α-Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen führte bei der Behandlung mit 0 U α-Amylase zu der gleichen SR-101-Freisetzung wie bei den Behandlungen mit 11,57 U oder 115,7 U α-Amylase (Abbildung 41 A und B). Dies wies darauf hin, dass das Schütteln mit Rührstäbchen unabhängig von der enzymatischen Behandlung, zu einem kompletten Aufbruch der Nanopartikel führte.



**Abbildung 41: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) α-Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.** A) Die Stärke-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 11,57 U, oder 115,7 U α-Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen behandelt. B) Die HES-Nanopartikel ( $6,7 \times 10^9$ ) mit eingekapseltem SR-101 wurden über 7 Tage hinweg mit 0 U, 11,57 U, oder 115,7 U α-Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen behandelt. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des freigewordenen SR-101 gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus vier Durchgängen, sowie die Standardabweichungen.

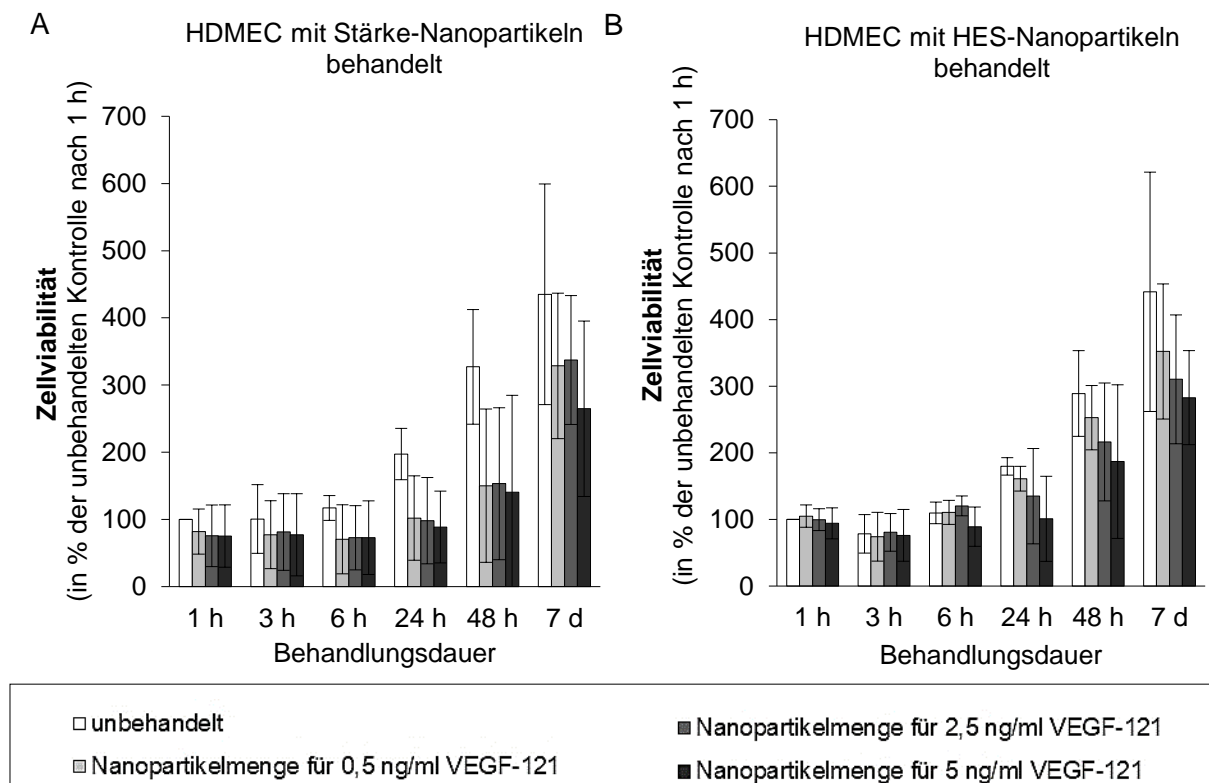
### 3.3.5.2 Zellviabilität unter Nanopartikel-Behandlung

Es war noch unbekannt, ob die Stärke- oder die HES-Nanopartikel einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität der für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents verwendeten Zelltypen haben. Um dies zu untersuchen, wurden HDMEC, Fibroblasten, sowie Epithelzellen für bis zu 7 Tage mit unterschiedlichen Mengen der zwei verschiedenen nicht aufgebrochenen Nanopartikel-Typen behandelt und die Zellviabilität nach verschiedenen Behandlungsdauern gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Die Zellviabilität von unbehandelten HDMEC stieg über 7 Tage hinweg an. Auch die Zellviabilität der behandelten HDMEC mit den verschiedenen Stärke-Nanopartikelmengen mit dem Inhalt einer VEGF-121-Konzentration von 0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml oder 5 ng/ml stieg über 7 Tage hinweg an. Dieser Anstieg war jedoch geringer als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 435 % angestiegen. Die Viabilität der HDMEC, die mit Stärke-

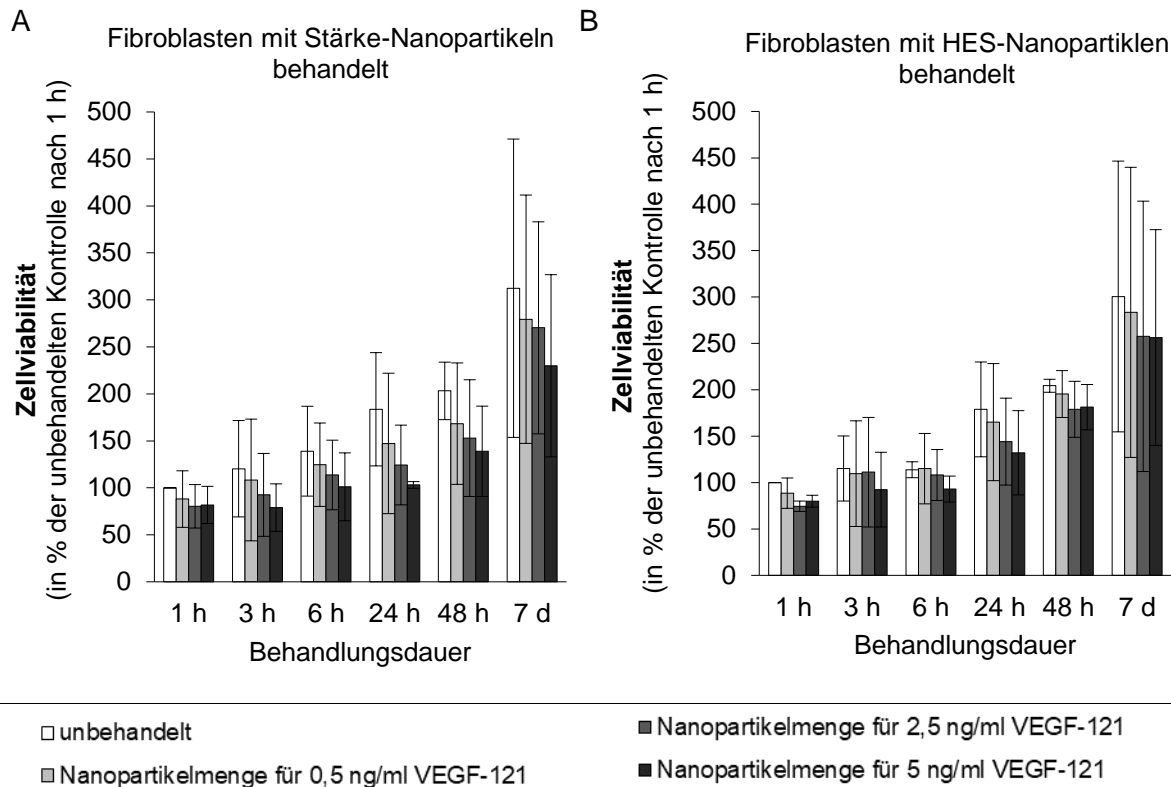


Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 328 %, die die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 337 %, und die die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 265 % an (Abbildung 42 A). Die Zellviabilität der mit HES-Nanopartikeln behandelten HDMEC verhielt sich ähnlich. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 441 % angestiegen. Die Viabilität der HDMEC, die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 352 %, die die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 310 %, und die die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 283 % an (Abbildung 42 B).



**Abbildung 42: Zellviabilität von HDMEC bei Stärke- sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** A) HDMEC wurden mit Stärke-Nanopartikelkonzentrationen für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. B) HDMEC wurden mit HES-Nanopartikeln für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

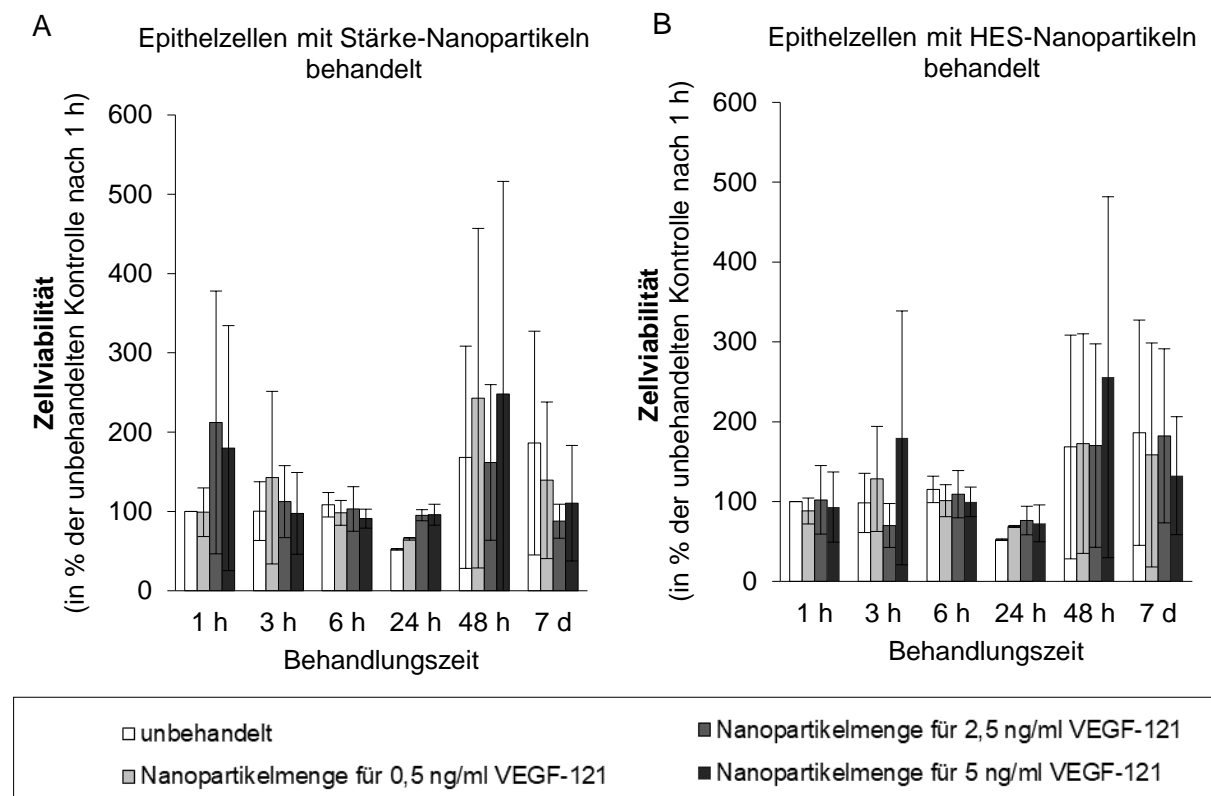
Die Zellviabilität von unbehandelten Fibroblasten stieg über 7 Tage hinweg an. Auch die Zellviabilität der behandelten Fibroblasten mit den verschiedenen Stärke-Nanopartikelmengen mit dem Inhalt einer VEGF-121-Konzentration von 0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml oder 5 ng/ml stieg über 7 Tage hinweg an. Dieser Anstieg war jedoch ebenfalls geringer als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 312 % angestiegen. Die Viabilität der Fibroblasten, die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 279 %, die, die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 270 %, und die, die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 230 % an (Abbildung 43 A). Die Zellviabilität der mit HES-Nanopartikeln behandelten Fibroblasten verhielt sich ähnlich. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 301 % angestiegen. Die Viabilität der Fibroblasten, die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 283 %, die die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 258 %, und die, die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 256 % an (Abbildung 43 B).



**Abbildung 43: Zellviabilität von Fibroblasten bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** A) Fibroblasten wurden mit Stärke-Nanopartikelkonzentrationen für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. B) Fibroblasten wurden mit HES-Nanopartikeln für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

Die Zellviabilität von unbehandelten Epithelzellen stieg über 7 Tage hinweg an. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 186 % angestiegen. Die Viabilität der Epithelzellen, die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 139 % an. Die Viabilität der Epithelzellen, die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, sank auf 88 % ab, und die die mit Stärke-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden stieg wiederum auf 110 % an (Abbildung 44 A). Die Zellviabilität der mit HES-Nanopartikeln behandelten Epithelzellen verhielt sich ähnlich. Die Zellviabilität der Kontrolle war nach 7 Tagen auf 186 % angestiegen. Die Viabilität der Epithelzellen, die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 158 %, die die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für

die Freisetzung von 2,5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 182 %, und die die mit HES-Nanopartikeln in einer Menge für die Freisetzung von 5 ng/ml VEGF-121 behandelt wurden, stieg auf 132 % an (Abbildung 44 B).



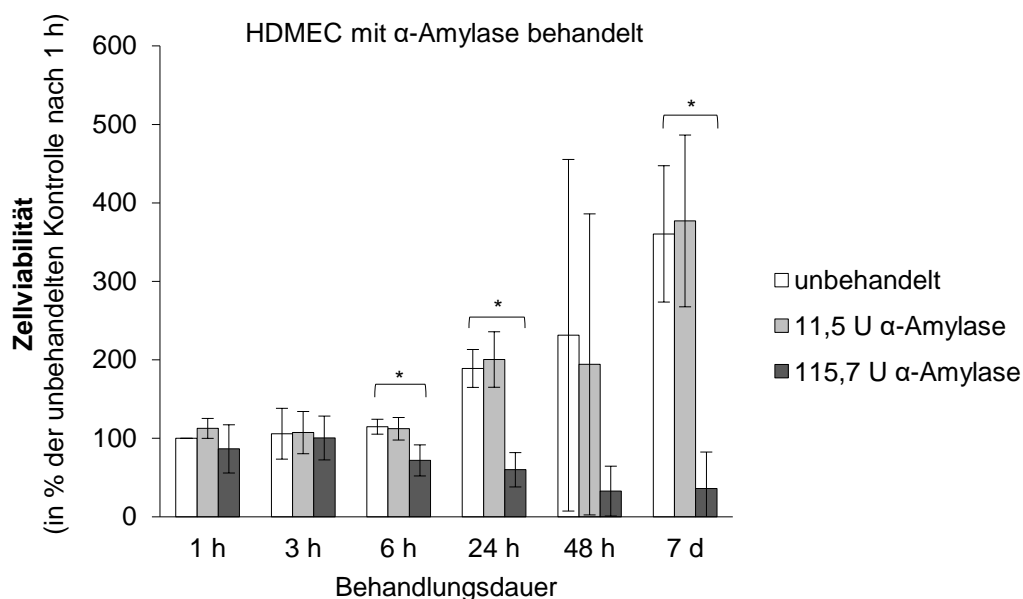
**Abbildung 44: Zellviabilität von Epithelzellen bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** A) Epithelzellen wurden mit Stärke-Nanopartikelkonzentrationen für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. B) Epithelzellen wurden mit HES-Nanopartikeln für die spätere Freisetzung von 0,5 ng/ml VEGF-121, 2,5 ng/ml VEGF-121 oder 5 ng/ml VEGF-121 über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

Die Stärke- sowie die HES-Nanopartikel hatten keinen signifikanten negativen Einfluss auf die Zellviabilität der für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents verwendeten Zelltypen. Die verschiedenen ausgetesteten Nanopartikelkonzentrationen waren somit, für die Anwendung bei der Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente geeignet.

### 3.3.5.3 Zellviabilität unter $\alpha$ -Amylase-Behandlung

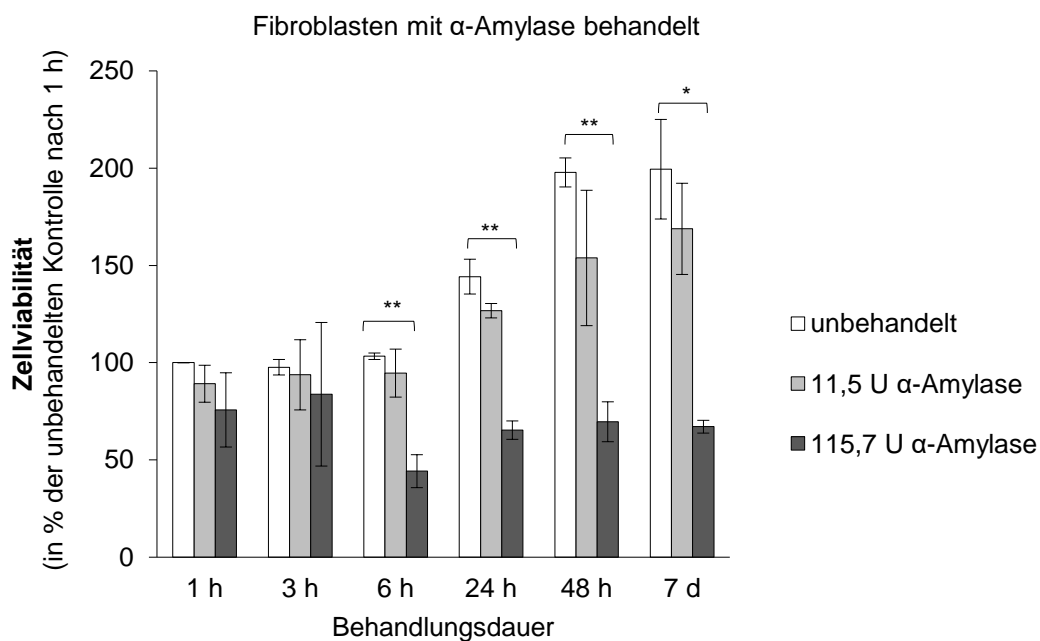
Auch der Einfluss der  $\alpha$ -Amylase auf die Zellviabilität der für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents verwendeten Zelltypen war noch unbekannt. Um dies zu untersuchen, wurden HDMEC, Fibroblasten, sowie Epithelzellen für bis zu 7 Tage mit unterschiedlichen Units (U) an  $\alpha$ -Amylase behandelt und die Zellviabilität nach verschiedenen Behandlungsdauern gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Die Zellviabilität von unbehandelten HDMEC stieg über 7 Tage hinweg auf 360 % an. Die Viabilität der HDMEC, die mit 11,5 U  $\alpha$ -Amylase behandelt wurden, stieg ebenfalls über die 7 Tage auf 377 % an. Die Behandlung der Zellen mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf 36 % nach 7 Tagen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Bereits nach 6 h und nach 24 h führte die Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 45).



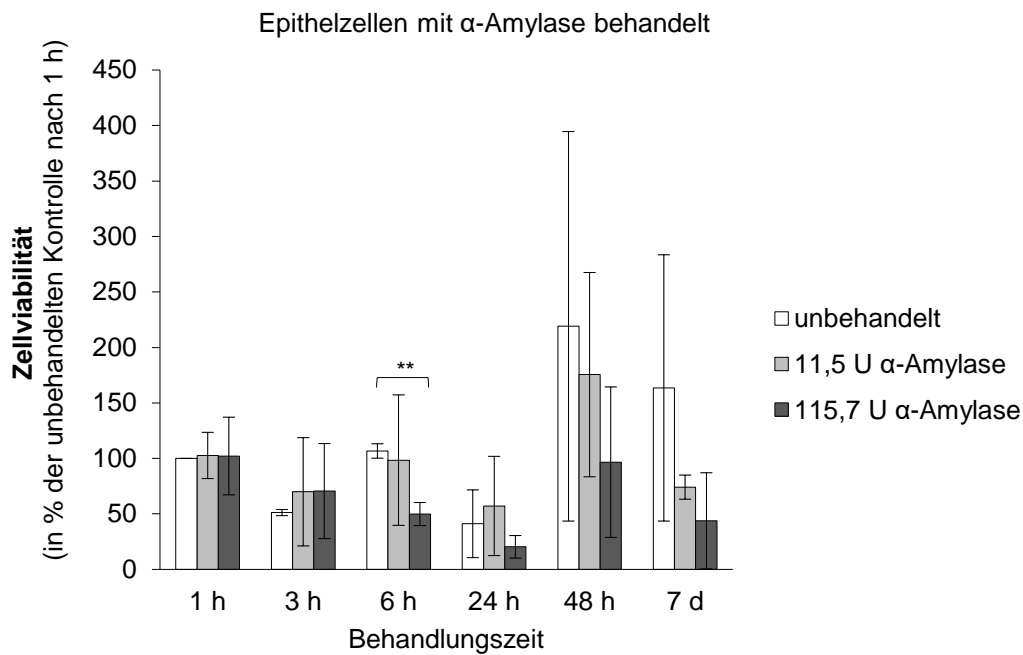
**Abbildung 45: Zellviabilität von HDMEC bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** HDMEC wurden mit 11,5 oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

Die Zellviabilität von unbehandelten Fibroblasten stieg über 7 Tage hinweg auf 199 % an. Die Viabilität der Fibroblasten, die mit 11,5 U  $\alpha$ -Amylase behandelt wurden, stieg ebenfalls über die 7 Tage auf 169 % an. Die Behandlung der Zellen mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf 67 % nach 7 Tagen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Bereits nach 6 h, 24 h und nach 48 h führte die Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Zellviabilität von Fibroblasten bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** Fibroblasten wurden mit 11,5 oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

Die Zellviabilität von unbehandelten Epithelzellen war nach 7 Tagen im Vergleich zu der Kontrolle nach 1 h auf 164 % erhöht. Die Viabilität der Epithelzellen, die mit 11,5 U  $\alpha$ -Amylase behandelt wurden, sank nach 7 d auf 74 % ab. Die Behandlung der Zellen mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase führte zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 44 % nach 7 Tagen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nach 1 h. Die Behandlung mit 115,7 U  $\alpha$ -Amylase führte nach 6 h zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Zellviabilität von Epithelzellen bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.** Epithelzellen wurden mit 11,5 oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase über 7 Tage hinweg behandelt. Nach verschiedenen Behandlungsdauern wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die gemittelten, prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 1 h, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, \*\*  $p < 0,01$ . Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert. Dieser Versuch wurde jeweils als Triplet-Ansatz drei Mal durchgeführt.

Die  $\alpha$ -Amylase hatte mit 11,5 U keinen signifikanten, negativen Einfluss auf die Zellviabilität der für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents verwendeten Zelltypen. Die Verwendung von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase hatte einen starken negativen Einfluss auf die Zellviabilität der verschiedenen Zelltypen. Somit war die Anwendung von 11,5 U  $\alpha$ -Amylase innerhalb der Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit gebundenen Nanopartikeln geeignet, jedoch nicht die Anwendung von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase.

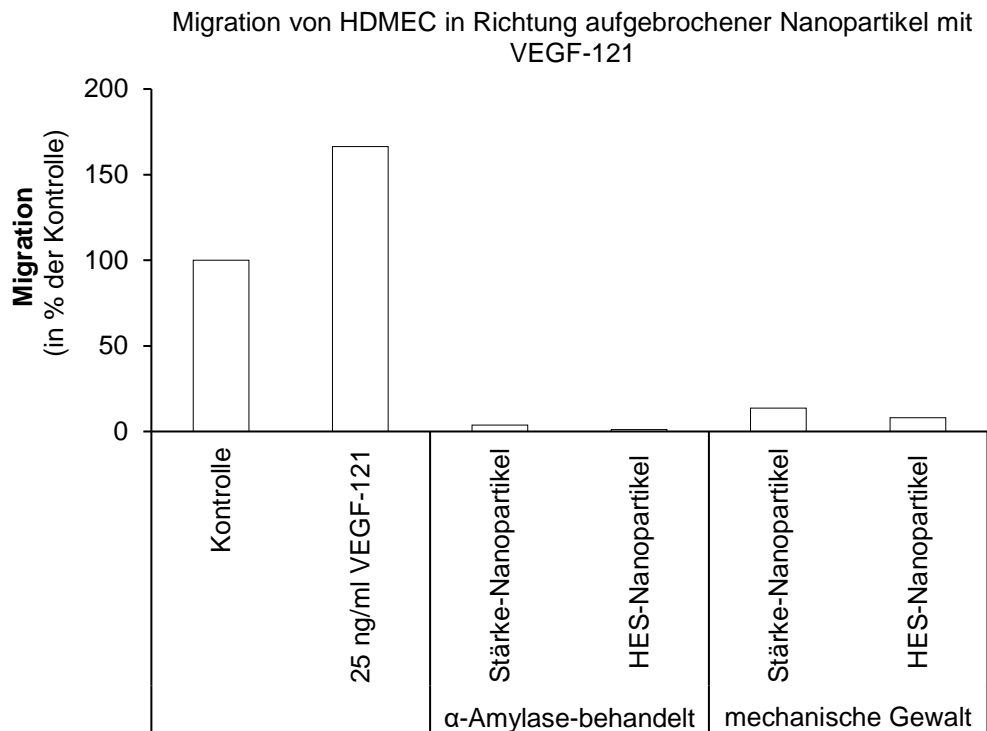
#### 3.3.5.4 VEGF-121-Freisetzung aus Nanopartikeln

Mittels verschiedenster Verfahren wurde versucht VEGF-121 aus den Stärke- sowie den HES-Nanopartikeln, welche VEGF-121 eingekapselt hatten freizusetzen. Dabei wurden die Verfahren zum Aufbruch dieser Nanopartikel nach den erfolgreichen Methoden für das Aufbrechen der Stärke- und HES-Nanopartikel mit eingekapseltem SR-101 angewendet.

Die Stärke- sowie HES-Nanopartikel mit eingekapseltem VEGF-121 wurden mit 11,5 U  $\alpha$ -Amylase, 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, bis hin zu 1000 U  $\alpha$ -Amylase behandelt. Außerdem wurde versucht eine VEGF-121-Freisetzung aus den Nanopartikeln mit mechanischer Gewalt mittels Rührstäbchen, mit Ultraschallstößen oder einer Kombination aus mechanischer Gewalt, Ultraschallstößen sowie  $\alpha$ -Amylase zu erreichen. Mittels sämtlicher angewendeter Verfahren konnte keine Freisetzung von VEGF-121 aus den Stärke- sowie den HES-Nanopartikeln erzielt werden.

Auch die Migration von HDMEC in Richtung aufgebrochener Nanopartikel mit VEGF-121 war erfolglos. Die mit  $\alpha$ -Amylase aufgebrochenen Stärke- sowie HES-Nanopartikel hatten keine chemotaktische Wirkung auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen. Auch die Nanopartikel, die mit mechanischer Gewalt aufgebrochen wurden, zeigten keine chemotaktische Wirkung auf die Endothelzellen (Abbildung 48).





**Abbildung 48: Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung aufgebrochener Stärke- und HES-Nanopartikel mit VEGF-121.** Die Migration von HDMEC in Richtung der aufgebrochenen Stärke- sowie HES-Nanopartikel mit 25 ng/ml VEGF-121 wurde mittels Boyden-Kammer-Migrationsassay analysiert. Die Nanopartikel wurden zum einen mittels 115,7 U  $\alpha$ -Amylase, zum anderen mittels mechanischer Gewalt durch Rührstäbchen aufgebrochen. Als Leerkontrolle wurde serumfreies HDMEC-Medium verwendet. Als Positivkontrolle wurden 25 ng/ml VEGF-121 verwendet. Dargestellt sind die prozentuale Werte aus einem Durchgang in Bezug auf die serumfreie HDMEC-Medium-Kontrolle.

Die Anwendung der untersuchten Stärke- und HES-Nanopartikel mit eingekapseltem VEGF-121 waren nicht für die gewünschte Modifikation des Mundschleimhaut-Äquivalents und die Optimierung der Prävasikularisierung geeignet.

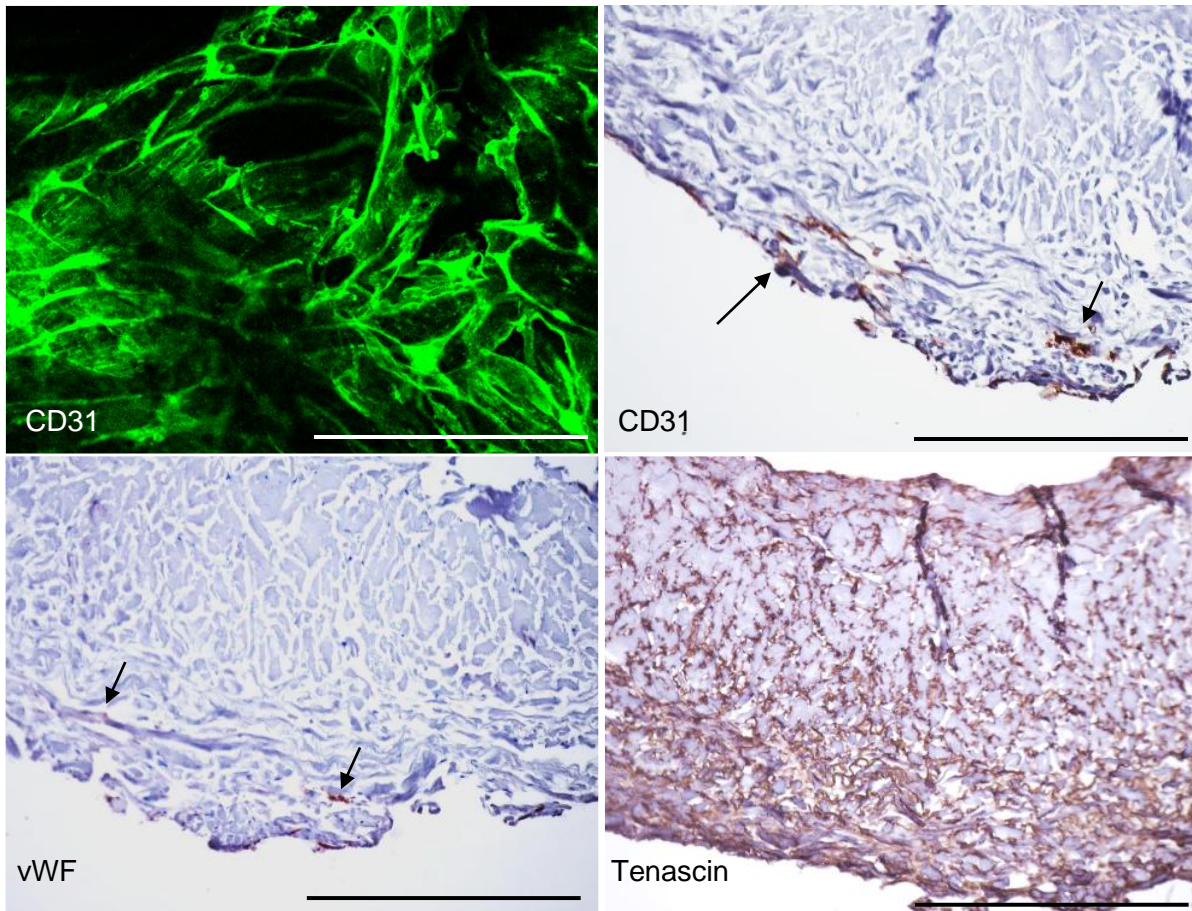
### 3.4 Optimierung der Prävasikularisation mittels mechanischer Verfahren

#### 3.4.1 Injizieren der Endothelzellen in das Mundschleimhaut-Äquivalent

Um die Prävasikularisierung über ein mechanisches Verfahren zu optimieren, wurden die Endothelzellen in die Kollagenmatrix injiziert. Ziel war es die Endothelzellen bereits bei der Zellbesiedlung in tiefen Bereichen der Kollagenmatrices zu lokalisieren, so dass sie dort Gefäßstrukturen ausbilden.

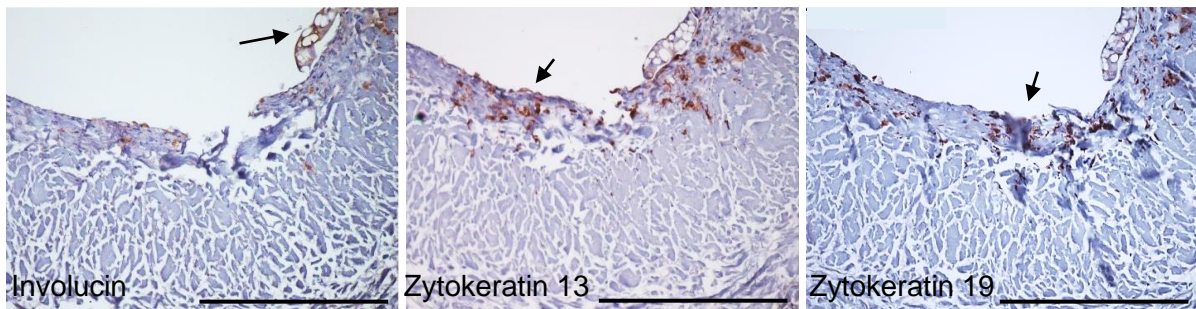
Die injizierten HDMEC hatten an Kulturtag 33 Gefäßstrukturen in der Kollagenmatrix ausgebildet. Die Endothelzellen ließen sich jedoch nur sehr unpräzise in die Kollagenmatrix injizieren, so dass eine tiefe Lokalisation nicht gewährleistet werden

konnte. CD31- sowie vWF-positive Zellen waren zum Großteil eher in oberflächlichen Bereichen des Mundschleimhaut-Äquivalents lokalisiert. Die Fibroblasten bzw. die Ausbildung der extrazellulären Matrix wurden durch die Injektionsstiche in die Kollagenmatrix nicht beeinträchtigt (Abbildung 49).



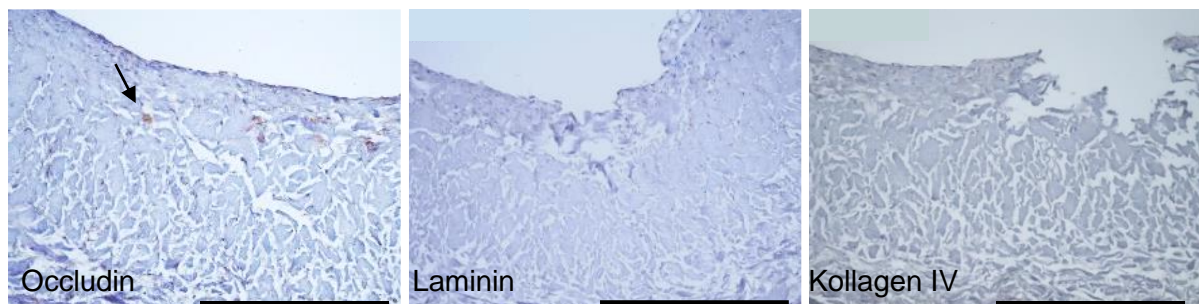
**Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Darstellung der Gefäßstrukturen, sowie Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden.** Hierfür wurden CD31 und vWF als Marker für Endothelzellen (Pfeile) herangezogen, die dem Nachweis der Ausbildung der extrazellulären Matrix und dem indirekten Nachweis von Fibroblasten dienen. Mundschleimhaut-Äquivalente, bei denen HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden, wurden an Kulturtag 33 mit Antikörpern markiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, sowie Immunhistochemie untersucht. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde sechs Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Die Ausbildung des mehrschichtigen Epithels ist von der Injektion der Endothelzellen nicht beeinträchtigt. Die Muster der Invocarin-, Zytokeratin 13-, sowie Zytokeratin 19-Färbung sind vergleichbar mit den Färbungen der Mundschleimhaut-Äquivalente ohne Manipulation durch Injektion (Abbildung 50; Vergleich Abbildung 21, 22 und 23).



**Abbildung 50: Immunhistochemische Färbung von Involucrin, Zytokeratin 13, und Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden.** Involucrin wurde als Marker für ausdifferenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde sechs Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Die Ausprägung von Occludin, sowie von Laminin und Kollagen IV als Basalmembran-Marker und Nachweis der Funktionalität des Epithels war durch die Injektion der Endothelzellen negativ beeinflusst. Die Occludin-Färbung war nur an vereinzelt Stellen innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents vorhanden. Eine Laminin- sowie Kollagen IV-Färbung war nicht nachweisbar (Abbildung 51; Vergleich Abbildung 24, 25 und 26).



**Abbildung 51: Immunhistochemische Färbung von Occludin, Laminin, Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden.** Occludin (Pfeil) wurde als Bestandteil von *Tight junctions* zur Analyse der Funktionalität der Epithelzellschichten verwendet. Laminin wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Kollagen IV wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde sechs Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Die Optimierung der Prävasikularisierung war durch die Injektion der Endothelzellen nicht möglich. Zum einen ließen sich die Endothelzellen nicht präzise genug injizieren,

um eine tiefe Lokalisation der Zellen und somit der Gefäßstrukturen zu gewährleisten. Zum anderen wurde die Funktionalität der Epithelzellen und die Ausbildung der Basalmembran durch die Manipulation der Kollagenmatrix durch die Injektion negativ beeinträchtigt.

### 3.5 Anregung der Gefäß- sowie Epithelausbildung der Mundschleimhaut-Äquivalente mittels ESWT-Anwendung

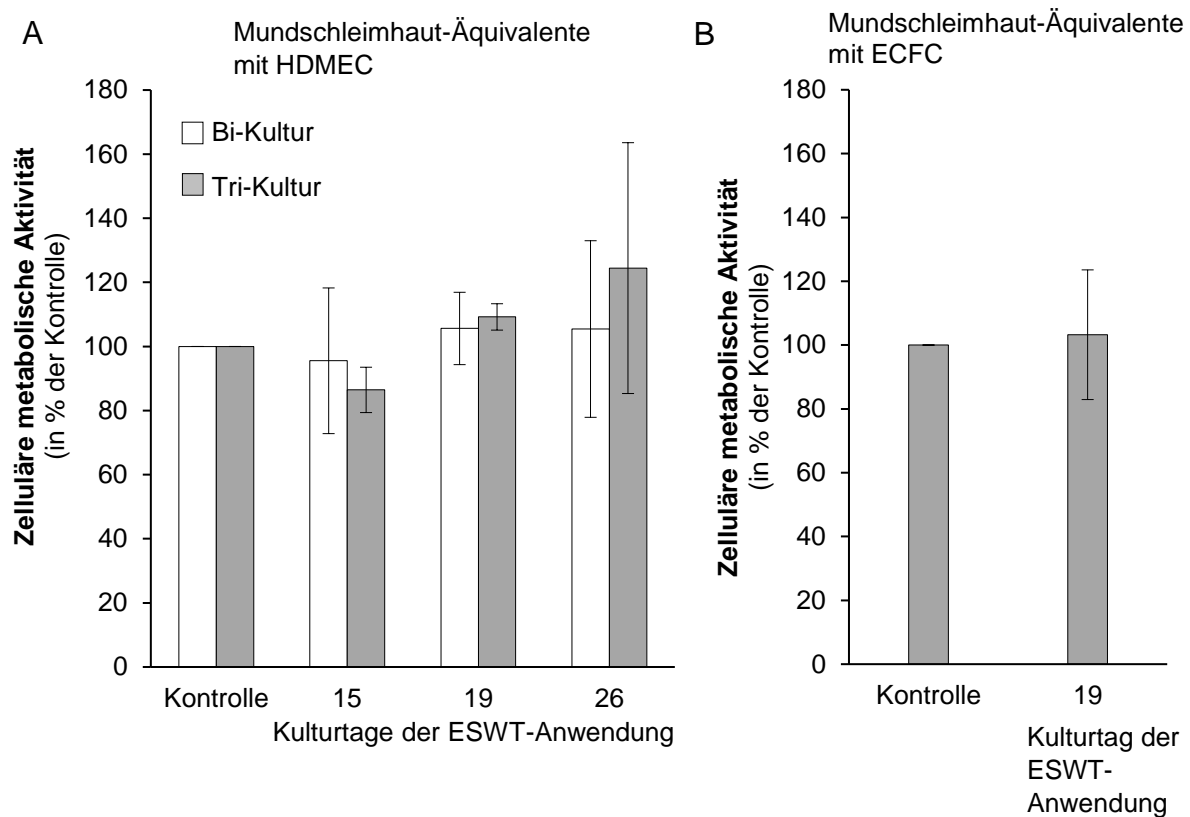
Während des Herstellungsprozesses wurden die Mundschleimhaut-Äquivalente mit extrakorporalen Stoßwellen behandelt. Danach wurde die Auswirkung auf die Zellviabilität, die Prävaskularisierung und die Ausbildung des Epithels sowie der Basalmembran untersucht.

#### 3.5.1 Zellviabilität nach ESWT-Anwendung

Die Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die Zellviabilität der Mundschleimhaut-Äquivalente wurde mittels alamarBlue™-Assay untersucht. Um die Wirkung der ESWT-Anwendung auf die Epithelzellen in den Mundschleimhaut-Äquivalenten besser beurteilen zu können, wurde die Zellviabilität von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Endothelzellen mit der Zellviabilität von Tri-Kulturen (Mundschleimhaut-Äquivalente) mit Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen verglichen. Bei den mit Bi- oder Tri-Kultur besiedelten Kollagenmatrices wurde an Kulturtag 15, 19 oder 26 eine ESWT-Anwendung durchgeführt und jeweils zwei Tage später wurde die Zellviabilität gemessen. Unbehandelte besiedelte Kollagenmatrices dienten als Kontrolle.

Bei den zellbesiedelten Kollagenmatrices, bei denen an Kulturtag 15 die ESWT-Anwendung stattfand, war die Zellviabilität der Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC nicht signifikant auf 96 %, und die der Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC nicht signifikant auf 86 % im Vergleich zur Kontrolle verringert. Wurden Bi- und Tri-Kulturen an Kulturtag 19 mit Stoßwellen behandelt, war die Zellviabilität der Bi-Kultur nicht-signifikant auf 106 %, und die der Tri-Kultur nicht-signifikant auf 109 % erhöht. Bei den Bi- und Tri-Kulturen, welche an Kulturtag 26 mit Stoßwellen behandelt wurden, stieg die Zellviabilität der Bi-Kultur nicht signifikant auf 105 %, und die der Tri-Kultur nicht signifikant auf 124 % an (Abbildung 52 A). Bei Tri-Kulturen, die aus Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC auf einer Kollagenmatrix bestanden, war die

Zellviabilität nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 auf 103 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 52 B).

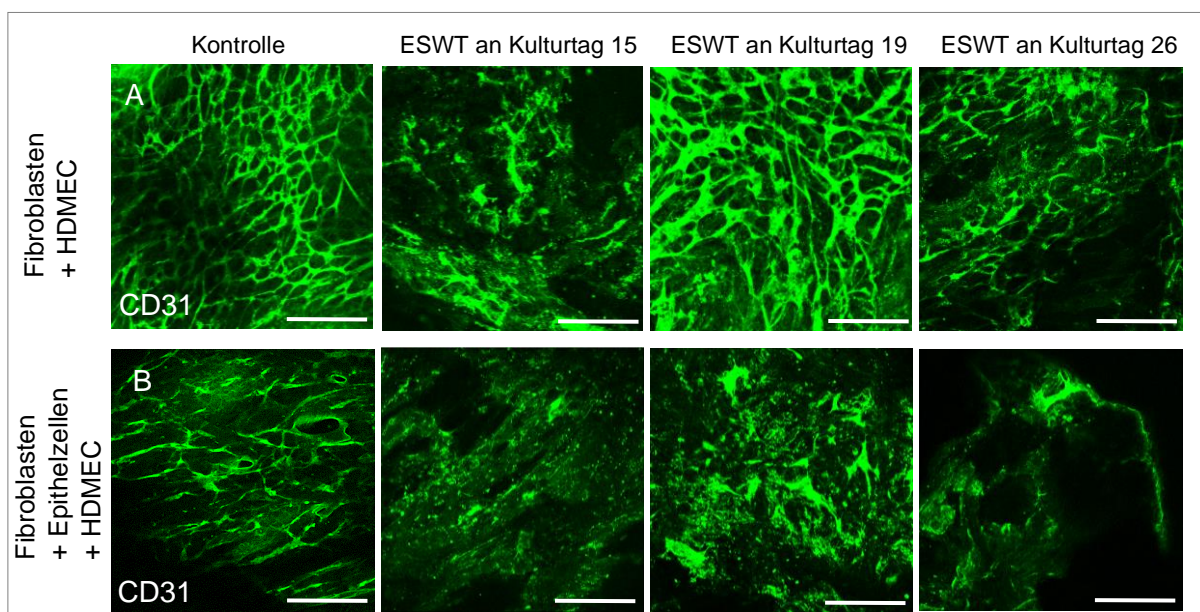


**Abbildung 52: Zellviabilität von Bi-Kulturen aus Endothelzellen und Fibroblasten oder Tri-Kulturen aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen auf Kollagenmatrices zwei Tage nach der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT)-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** A) Es wurden Bi-Kulturen mit HDMEC und Fibroblasten sowie Tri-Kulturen mit HDMEC, Fibroblasten und Epithelzellen hergestellt und mit Stoßwellen an Kulturtag 15, 19 oder 26 behandelt. Unbehandelte Bi- und Tri-Kulturen dienen als Kontrolle. Zwei Tage nach der ESWT-Anwendung wurde mittels alamarBlue™-Assay die Zellviabilität gemessen. Die Messungen wurden in doppelter Ausführung durchgeführt und dreimal wiederholt. B) Es wurden Tri-Kulturen mit ECFC, Fibroblasten und Epithelzellen hergestellt und mit Stoßwellen an Kulturtag 19 behandelt. Unbehandelte Tri-Kulturen dienen als Kontrolle. Zwei Tage nach der ESWT-Anwendung wurde mittels alamarBlue™-Assay die Zellviabilität gemessen. Die Messung wurde in einfacher Ausführung durchgeführt und vier Mal wiederholt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, sowie die Standardabweichungen.

### 3.5.2 Gefäßausbildung nach ESWT-Anwendung

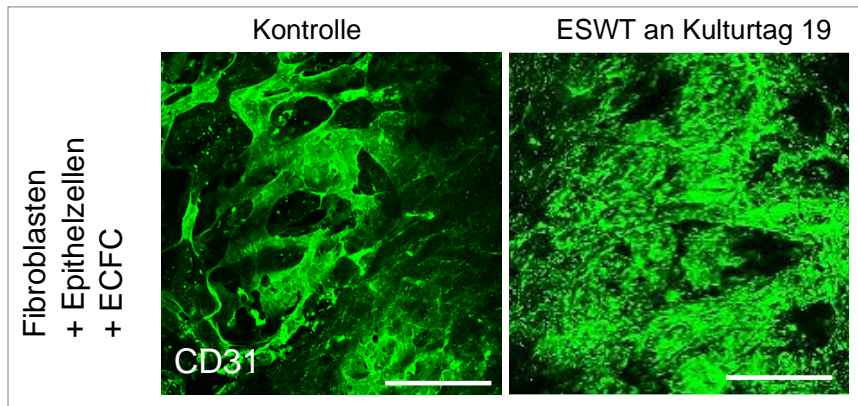
Für die Beurteilung der Gefäßausbildung nach der ESWT-Anwendung, wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Endothelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen hergestellt und an Kulturtag 15, 19 oder 26 mit Stoßwellen behandelt. Unbehandelte Kulturen dienen als Kontrolle. An Kulturtag 33 wurde die Kultivierung beendet und die Gefäßausbildung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von CD31 beurteilt.

Die Behandlung von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC mit Stoßwellen an Kulturtag 15 führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Gefäßstrukturen an Kulturtag 33 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch die Behandlung an Kulturtag 26 von Bi-Kulturen mit Stoßwellen führte zu einer Verschlechterung der Ausbildung von Gefäßstrukturen. Die Behandlung der Bi-Kulturen mit Stoßwellen an Kulturtag 19 führte zu ähnlich ausgeprägten Gefäßstrukturen als bei der Kontrolle (Abbildung 53 A). Die Behandlung von Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC (Mundschleimhaut-Äquivalent) mit Stoßwellen an Kulturtag 15, 19 oder 26 führte zu einer schlechteren Ausbildung von Gefäßstrukturen als bei der Bi-Kultur. Nach der Behandlung der Tri-Kulturen mit Stoßwellen an Kulturtag 19 waren zumindest noch Fragmente der Gefäßstrukturen vorhanden (Abbildung 53 B). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden für Versuche mit Tri-Kulturen mit ECFC und für die Anwendung der Mundschleimhaut-Äquivalente *in ovo* anschließend die Kulturen auf den Kollagenmatrices an Kulturtag 19 mit Stoßwellen behandelt



**Abbildung 53: Ausbildung von Gefäßstrukturen von HDMEC in Bi- und Tri-Kultur an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** A) Der Nachweis der Ausbildung von Gefäßstrukturen bei Bi-Kulturen mit HDMEC und Fibroblasten erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach CD31-Färbung an Kulturtag 33. Dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt. B) Der Nachweis der Ausbildung von Gefäßstrukturen bei Tri-Kulturen mit HDMEC, Fibroblasten und Epithelzellen erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach CD31-Färbung an Kulturtag 33. Dieser Versuch wurde drei durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

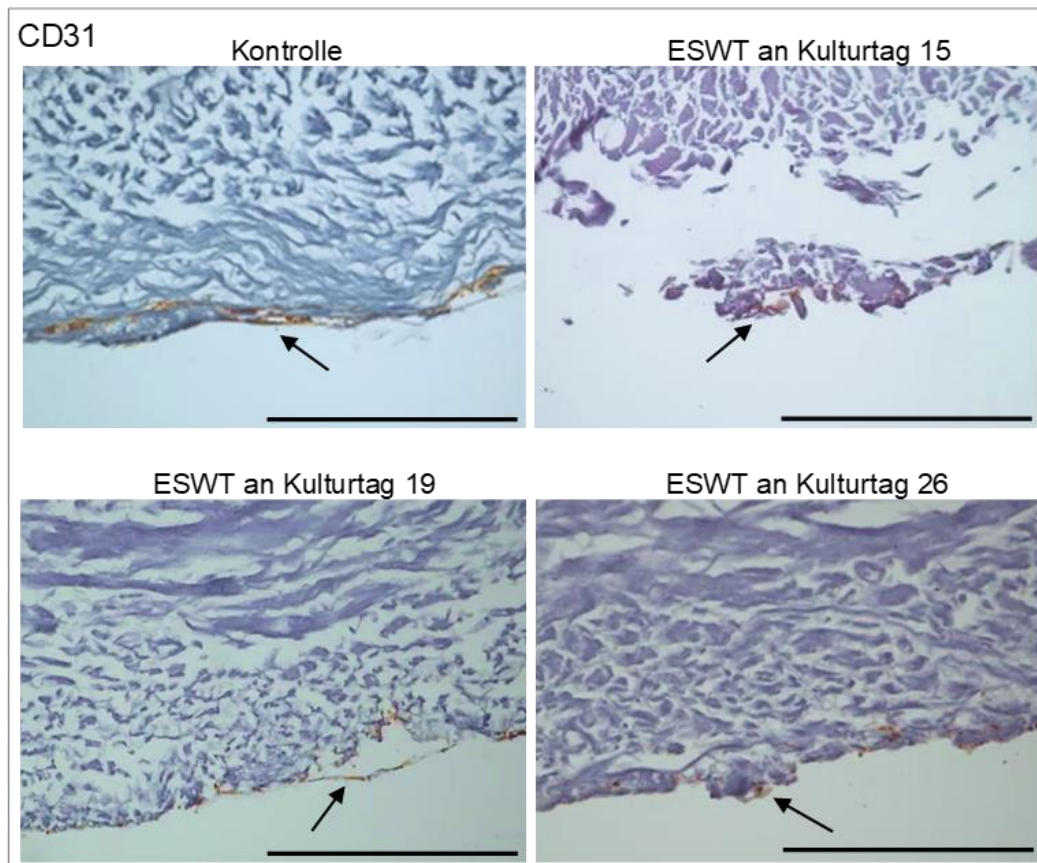
In Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC, die nicht mit Stoßwellen behandelt wurden, bildeten sich Gefäßstrukturen aus. Die Behandlung der Tri-Kulturen mit Stoßwellen an Kulturtag 19 führte zu einer schlechteren Ausbildung der Gefäßstrukturen als bei der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 54).



**Abbildung 54: Ausbildung von Gefäßstrukturen von ECFC in Tri-Kultur an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 19.** Der Nachweis der Ausbildung von Gefäßstrukturen bei Tri-Kulturen mit ECFC, Fibroblasten und Epithelzellen erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach CD31-Färbung an Kulturtag 33. Dieser Versuch wurde drei durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

### 3.5.3. Endothelzelllokalisierung nach ESWT-Anwendung

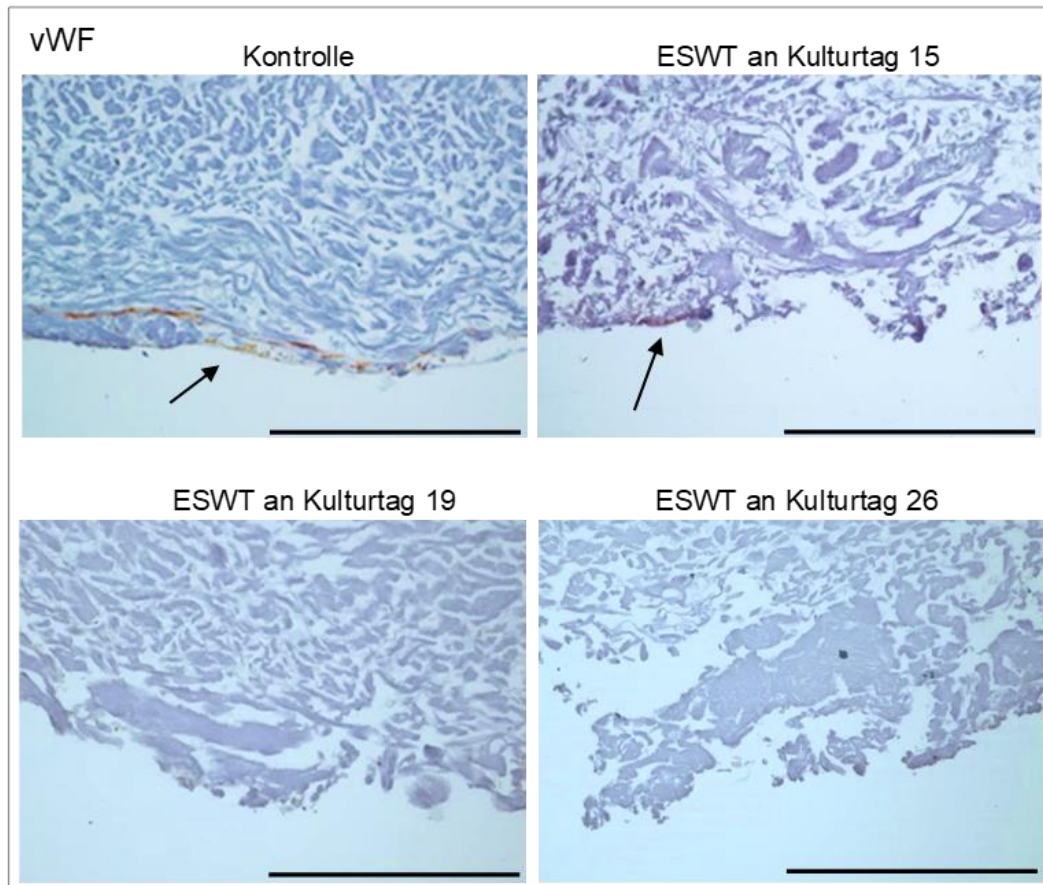
Die Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit Stoßwellen an Kulturtag 15, 19 oder 26 führte zu keinem Unterschied in der Tiefe der Lokalisierung der HDMEC im Vergleich zur Kontrolle. In allen Fällen waren die HDMEC oberflächlich auf der porösen Seite der Kollagenmatrix angesiedelt (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Immunhistochemische Färbung von CD31 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** CD31 wurde als Marker für Endothelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

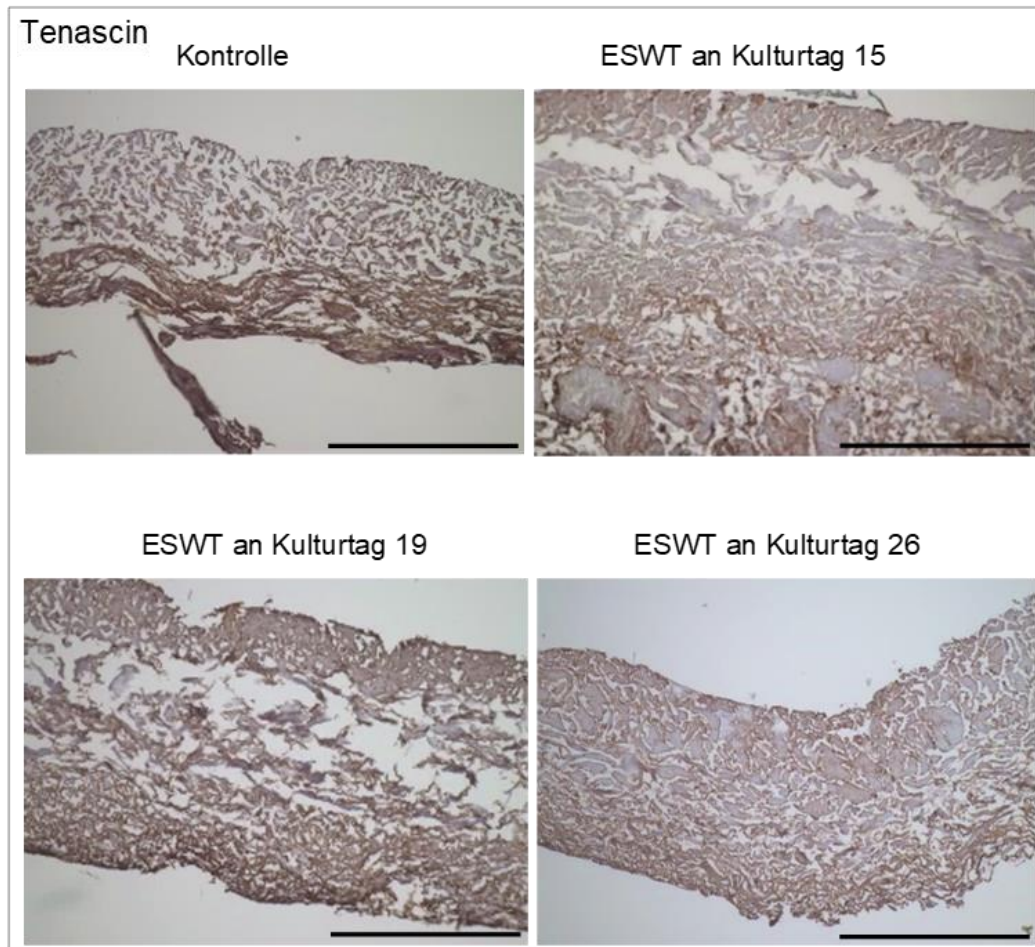
Dies bestätigte sich mit der immunhistochemischen vWF-Färbung der Mundschleimhaut-Äquivalente nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26. Die Ausprägung von vWF war zudem nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15 nur schwach und nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder 26 nicht vorhanden (Abbildung 56).





**Abbildung 56: Immunhistochemische Färbung von vWF des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** vWF wurde als Marker für Endothelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

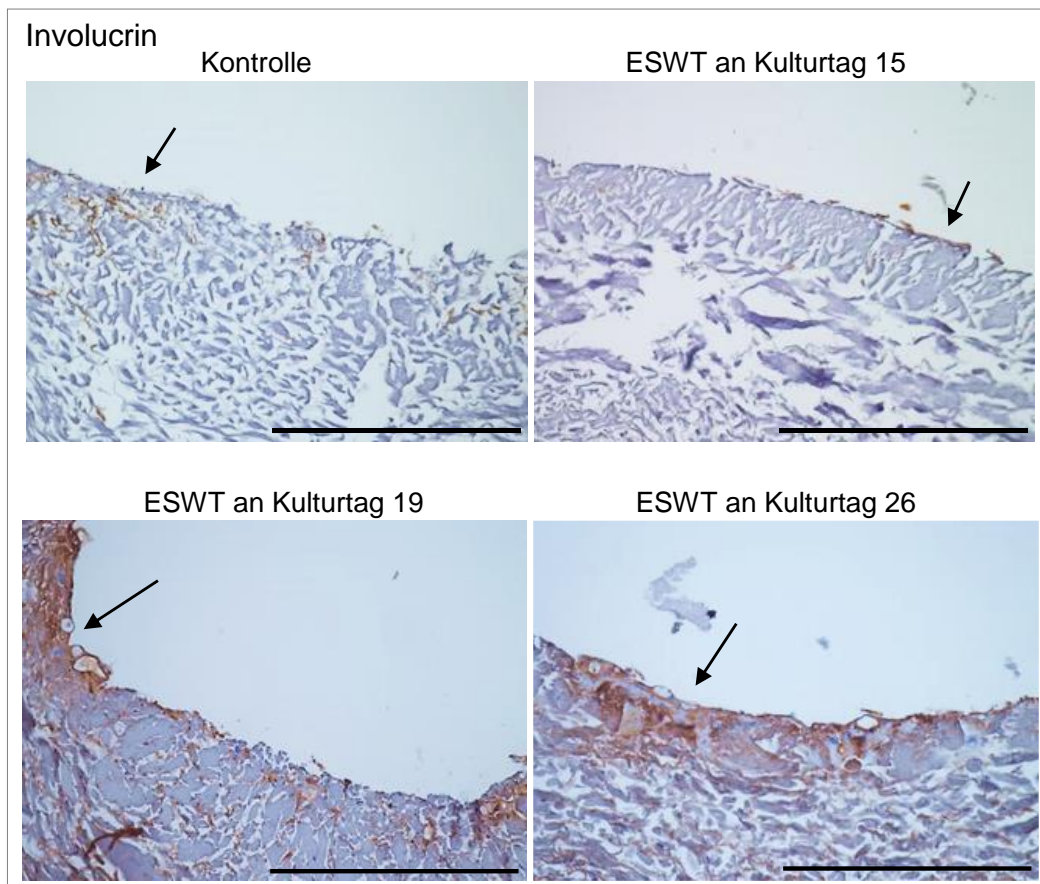
**3.5.4 Fibroblasten und die extrazelluläre Matrix nach ESWT-Anwendung**  
Die Verteilung des, von Fibroblasten sezernierten Tenascin im Mundschleimhaut-Äquivalent, war durch die ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26 nicht beeinträchtigt. Die Tenascin-Färbung deutete auf eine gleichmäßige Verteilung der extrazellulären Matrix hin (Abbildung 57).



**Abbildung 57: Immunhistochemische Färbung von Tenascin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Tenascin diente dem Nachweis der Ausbildung der extrazellulären Matrix und dem indirekten Nachweis von Fibroblasten. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

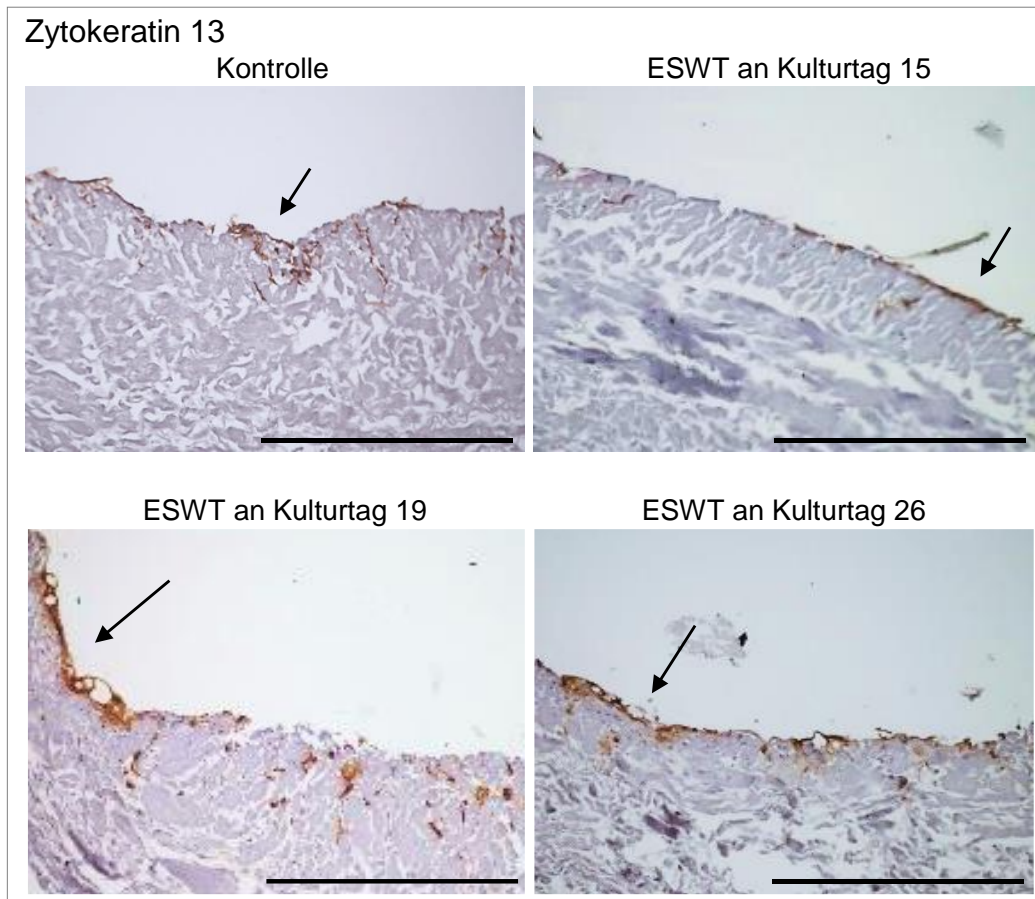
### 3.5.5 Ausbildung des Epithels nach ESWT-Anwendung

Die Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit Stoßwellen hatte einen Einfluss auf die Ausbildung und Differenzierung des mehrschichtigen Epithels. Die Behandlung an Kulturtag 19 oder 26 führte zu einer stärkeren Ausprägung von Involucrin als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung an Kulturtag 15 zeigte keine Verbesserung der Involucrin-Ausprägung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 58).



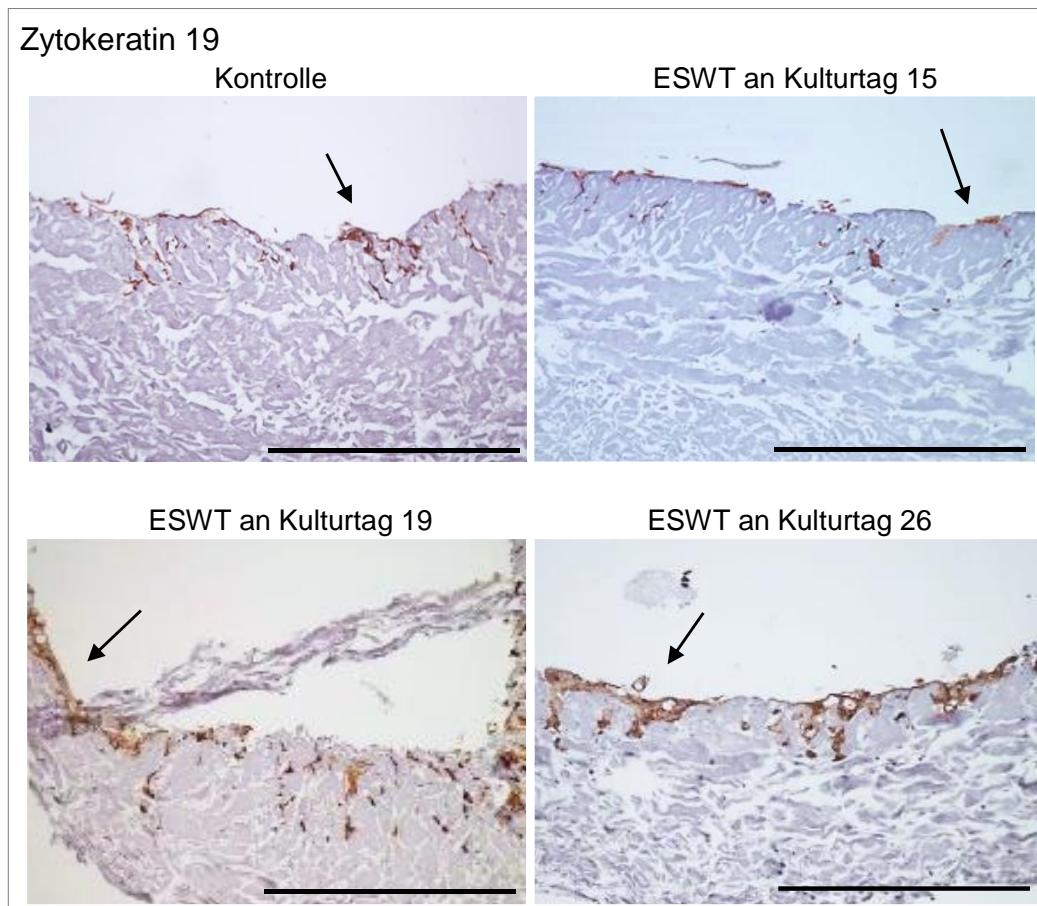
**Abbildung 58: Immunhistochemische Färbung von Involucrin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Involucrin wurde als Marker für ausdifferenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Die Behandlung mit Stoßwellen an Kulturtag 19 oder 26 führte ebenfalls zu einer stärkeren Ausprägung von Zytokeratin 13 als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung an Kulturtag 15 zeigte keine Verbesserung der Zytokeratin 13-Ausprägung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 59).



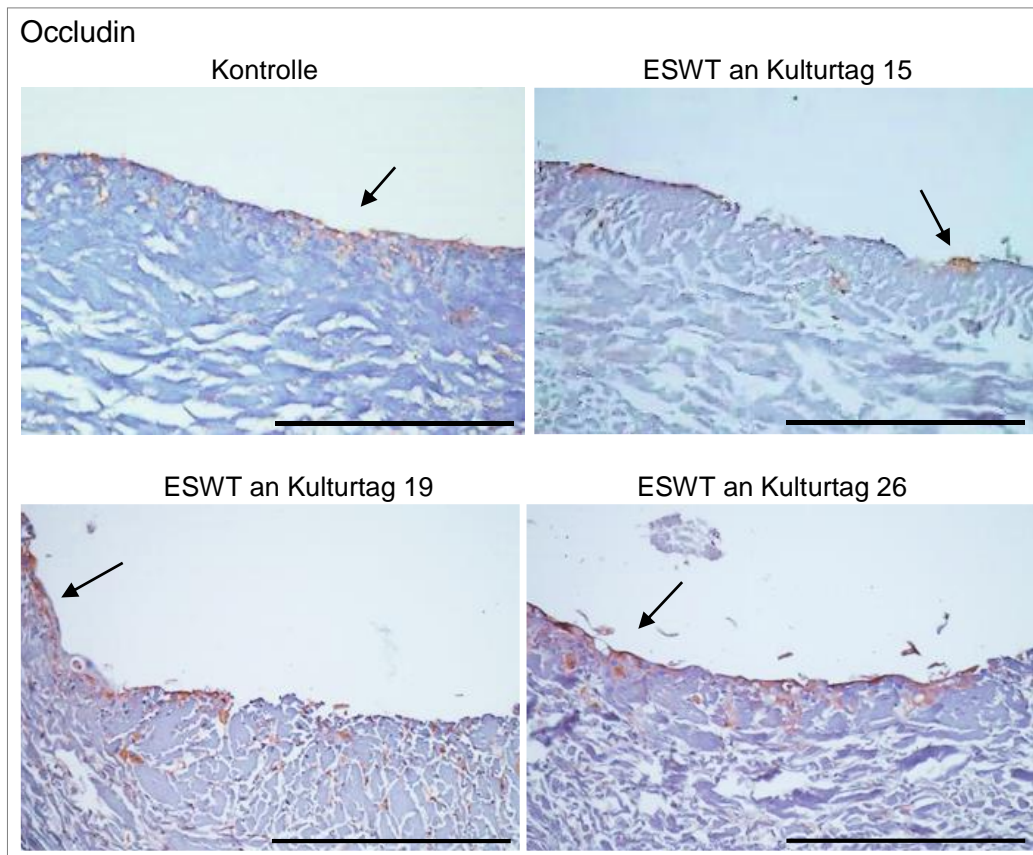
**Abbildung 59: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 13 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Auch die Ausprägung von Zytokeratin 19 war deutlich stärker nach der Stoßwellen-Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente an Kulturtag 19 oder 26. Die Behandlung an Kulturtag 15 zeigte keinen Einfluss auf die Ausprägung von Zytokeratin 19 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 60). Deutlich erkennbar war die Ko-Lokalisation von Zytokeratin 19, Zytokeratin 13 und Involucrin in den Mundschleimhaut-Äquivalenten (Vergleich Abbildung 60, 59 und 58).



**Abbildung 60: Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

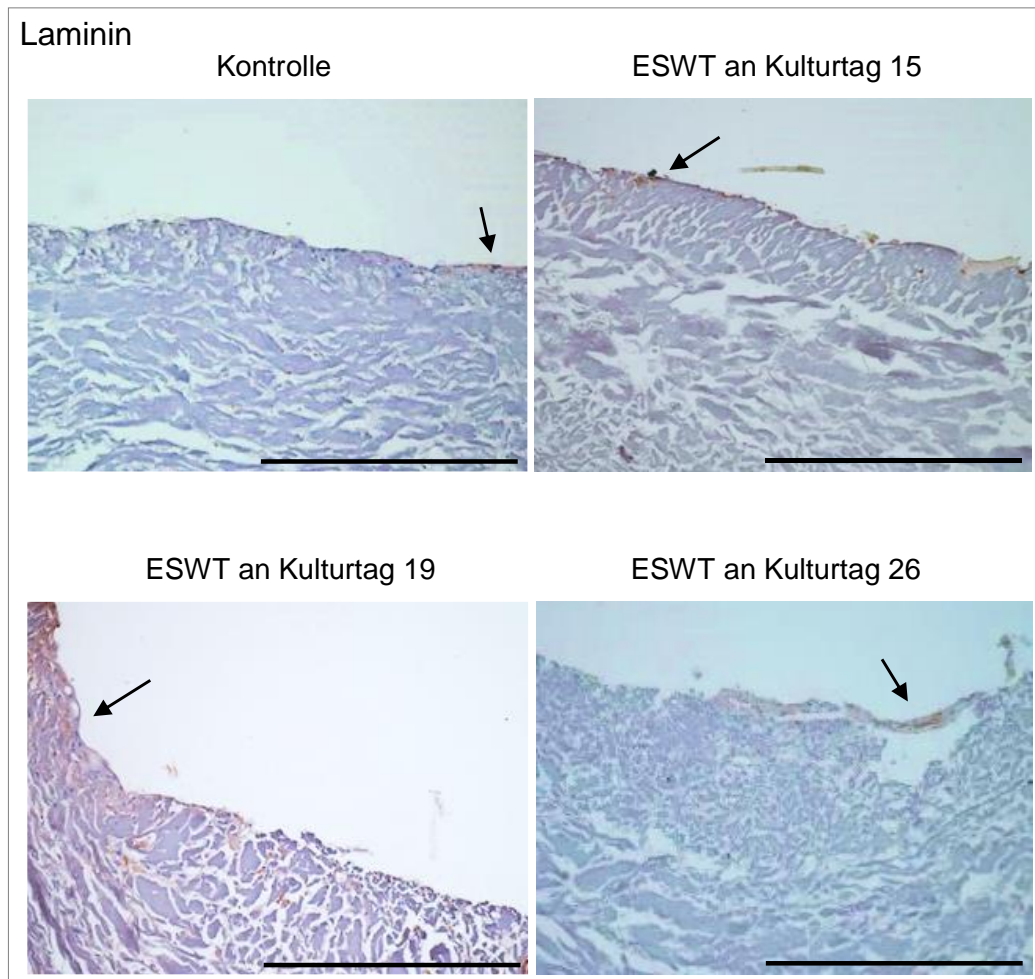
Die Ausprägung von Occludin war durch die Stoßwellen-Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente an Kulturtag 19 oder 26 ebenfalls positiv beeinflusst. Die Behandlung an Kulturtag 15 zeigte keinen Einfluss auf die Ausprägung von Occludin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Immunhistochemische Färbung von Occludin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Occludin (Pfeile) wurde als Bestandteil von *Tight junctions* zur Analyse der Funktionalität der Epithelzellschichten verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

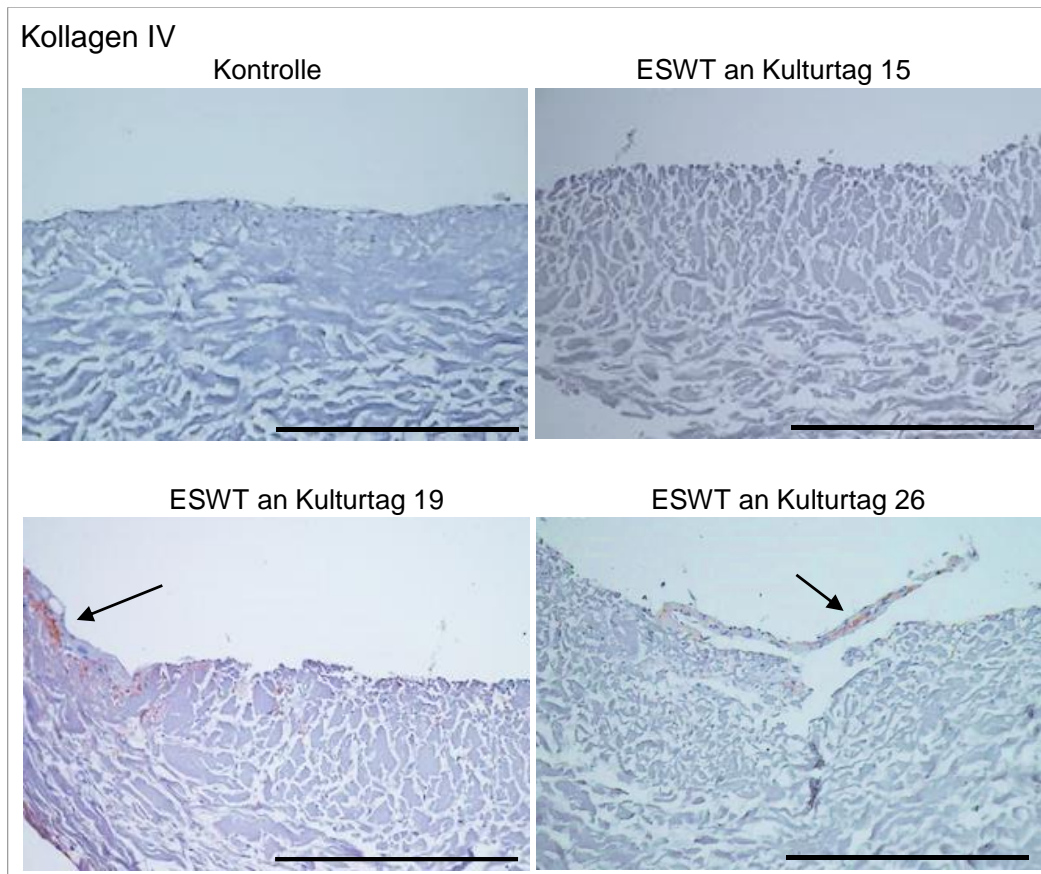
### 3.5.6 Ausbildung der Basalmembran nach ESWT-Anwendung

Die Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit Stoßwellen hatte einen positiven Einfluss auf die Ausbildung der Basalmembran. Die Behandlung an Kulturtag 19 oder 26 führte zu einer stärkeren Ausprägung von Laminin als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung an Kulturtag 15 zeigte ebenfalls eine leichte Verbesserung der Laminin-Ausprägung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 62).



**Abbildung 62: Immunhistochemische Färbung von Laminin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Laminin (Pfeile) wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Die Ausprägung von Kollagen IV wurde durch die Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit Stoßwellen an Kulturtag 19 oder 26 angeregt. Die unbehandelte Kontrolle zeigte keine Ausprägung von Kollagen IV. Die Behandlung mit Stoßwellen an Kulturtag 15 führte zu keiner Ausprägung von Kollagen IV in den Mundschleimhaut-Äquivalenten (Abbildung 63).



**Abbildung 63: Immunhistochemische Färbung von Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.** Kollagen IV (Pfeile) wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Die Anwendung der ESWT an Kulturtag 19 oder 26 innerhalb der Herstellung der Mundschleimhaut-Äquivalente führte zu einer stärkeren Ausbildung und Differenzierung des mehrschichtigen Epithels und der Basalmembran *in vitro*. Die Ausbildung von Gefäßstrukturen *in vitro* unter der Behandlung war nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 besser als an Kulturtag 26. Für die Stimulation der Mundschleimhaut-Äquivalente, welche im *in ovo*-Modell auf ihr Überleben und ihre Funktionalität untersucht wurden, wurden diese mit Stoßwellen an Kulturtag 19 behandelt.



### 3.6 Einwachsen des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo*

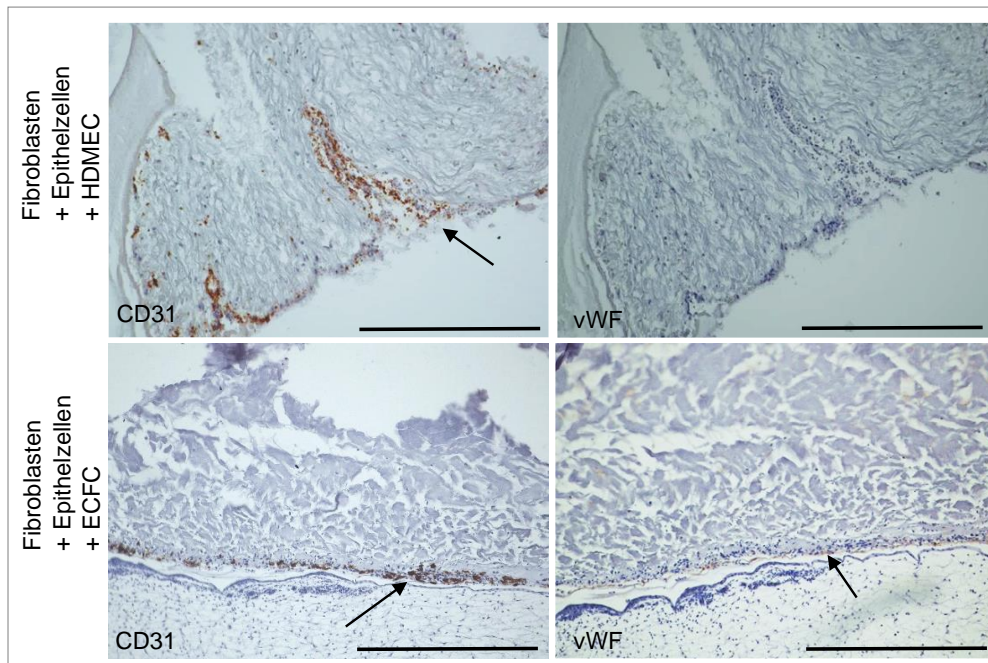
Die Beurteilung der potenziellen Gewebeintegration *in vivo* wurde mittels Chorioallantoismembran (CAM)-Assay *in ovo* durchgeführt. Dafür wurden Mundschleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC hergestellt. Zusätzlich wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen hergestellt als Kultur auf der Kollagenmatrix ohne Prävasikularisierung. Die *in vitro*-kultivierten Mundschleimhaut-Äquivalente und Bi-Kulturen wurden an Kulturtag 12 oder 33 auf die CAM *in ovo* überführt. Die besiedelten Kollagenmatrices, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, wurden entweder an Kulturtag 19 mit Stoßwellen behandelt oder waren unbehandelt.

Es wurden nur Mundschleimhaut-Äquivalente und Bi-Kulturen nach der *in ovo*-Kultivierung analysiert, die während der Kultivierung an die CAM angewachsen waren. Dies war etwa bei der Hälfte der Proben der Fall.

#### 3.6.1 Endothelzellen und Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent *in vivo*

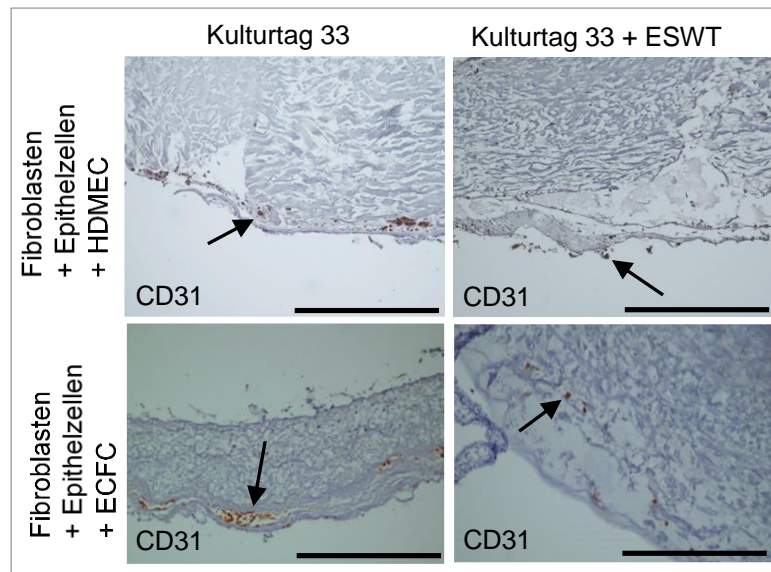
Für die Untersuchung der Endothelzellen in den Mundschleimhaut-Äquivalenten auf der CAM wurden die Endothelzellen an Kulturtag 12 auf den Kollagenmatrices ausgesät. Die Mundschleimhaut-Äquivalente wurden entweder 4 h nach der Endothelzell-Besiedelung an Kulturtag 12 oder an Kulturtag 33 auf die CAM überführt. Nach der Kultivierung auf der CAM, wurden die angewachsenen besiedelten Kollagenmatrices entnommen und immunhistochemisch analysiert.

Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, waren die HDMEC nach der Kultivierung auf der CAM deutlich CD31-positiv und vWF-negativ. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, waren die ECFC ebenfalls deutlich CD31-positiv und auch leicht vWF-positiv (Abbildung 64).



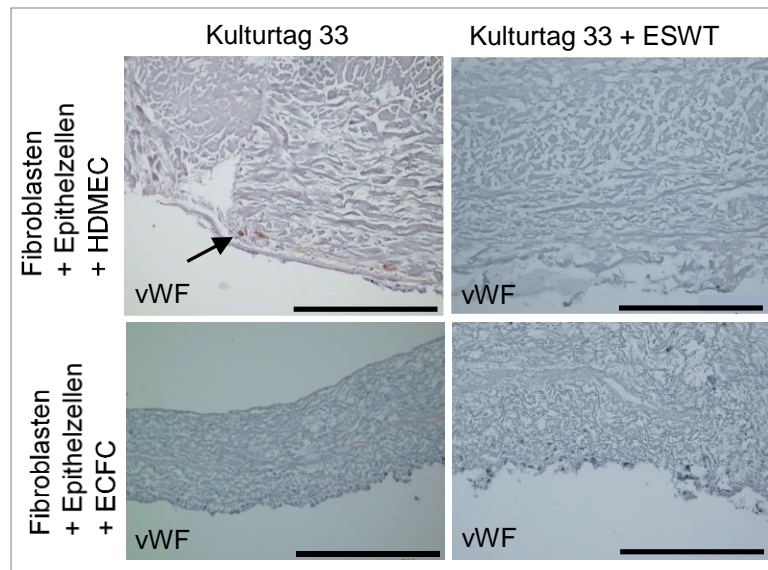
**Abbildung 64: Immunhistochemische CD31 und vWF-Färbung des Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** CD31 wurde als Marker für Endothelzellen (Pfeile) verwendet. vWF wurde ebenfalls als Marker für die Endothelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren die HDMEC ebenfalls CD31-positiv. Bei denen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, waren nur noch vereinzelt HDMEC mittels CD31 nachweisbar (Abbildung 65). Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren die ECFC CD31-positiv. Bei denen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, waren noch vereinzelt ECFC mittels CD31 nachweisbar (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Immunhistochemische CD31-Färbung des mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Die Mundschleimhaut-Äquivalente, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, wurden entweder an Kulturtag 19 mit Stoßwellen behandelt (ESWT-Anwendung) oder waren unbehandelt. CD31 wurde als Marker für Endothelzellen (Pfeile) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

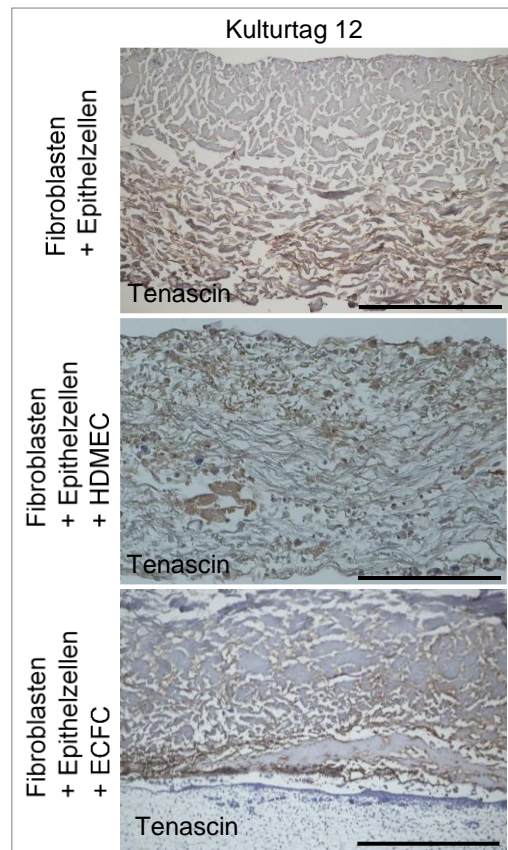
Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren die HDMEC vWF-positiv. Bei denen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, war eine vWF-Färbung nicht nachweisbar (Abbildung 66). Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren die ECFC vWF-negativ. Bei denen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, war eine vWF-Färbung ebenfalls nicht nachweisbar (Abbildung 66).



**Abbildung 66: Immunhistochemische vWF-Färbung des mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Die Mundschleimhaut-Äquivalente, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, wurden entweder an Kulturtag 19 mit Stoßwellen behandelt (ESWT-Anwendung) oder waren unbehandelt. vWF wurde als Marker für die Endothelzellen (Pfeil) verwendet. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

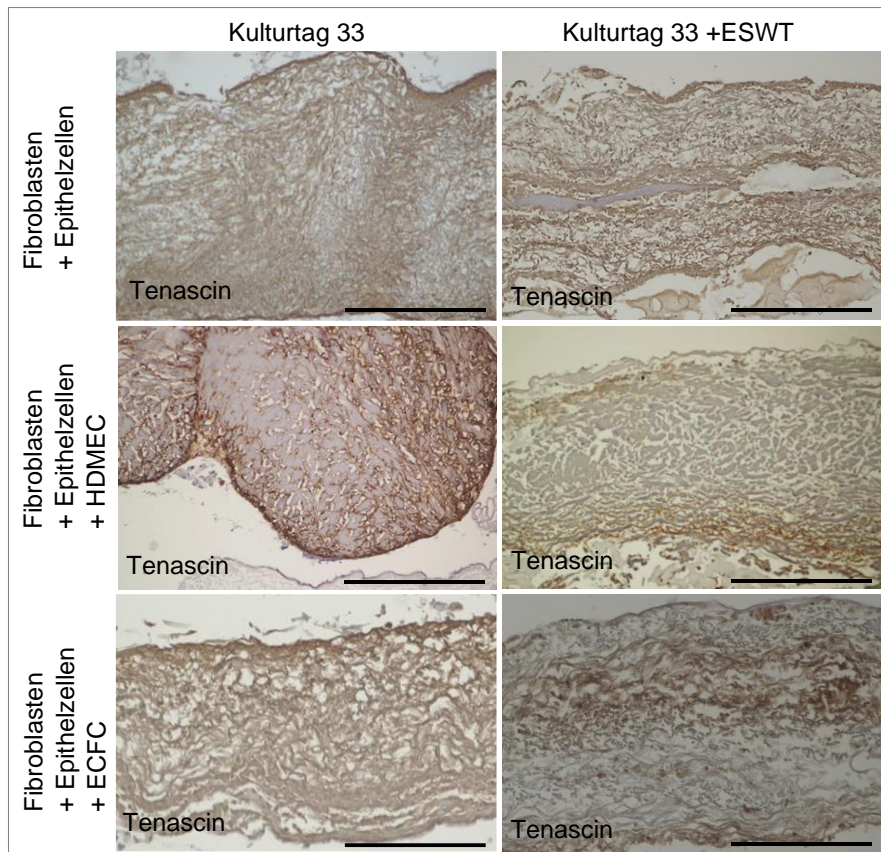
Für die Untersuchung der Ausbildung der extrazellulären Matrix (indirekter Fibroblasten-Nachweis) in den Mundschleimhaut-Äquivalenten *in ovo*, wurden die Mundschleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (HDMEC oder ECFC) und Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen an Kulturtag 12 oder an Kulturtag 33 auf die CAM überführt.

Bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, war die Tenascin-Verteilung in einem Großteil der Kollagenmatrix nachweisbar. Die Tenascin-Verteilung in den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, zeigte keinen wesentlichen Unterschied zu der Tenascin-Verteilung in der Bi-Kultur (Abbildung 67).



**Abbildung 67: Immunhistochemische Tenascin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Tenascin diente dem Nachweis der Ausbildung der extrazellulären Matrix und dem indirekten Nachweis von Fibroblasten. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

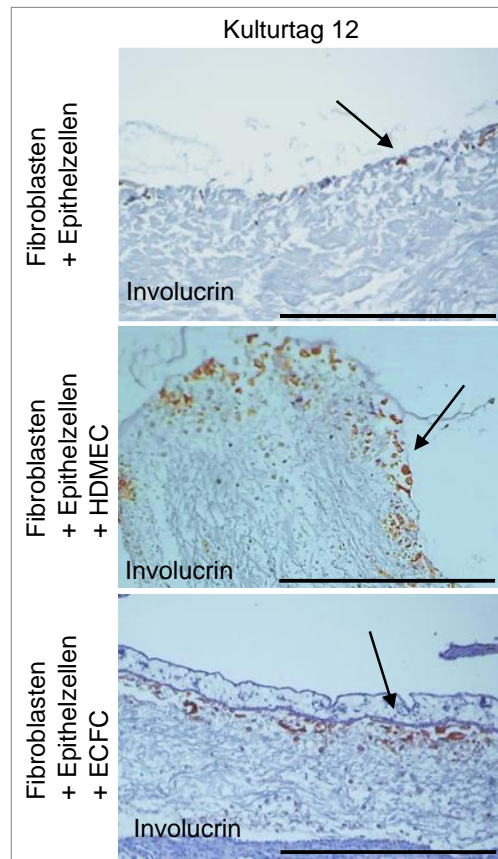
Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, war die Tenascin-Verteilung in der gesamten Kollagenmatrix nachweisbar. Bei denen, die mit Stoßwellen behandelt wurden zeigte sich kein Unterschied in der Tenascin-Verteilung. Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, zeigte sich kein Unterschied bei der Tenascin-Verteilung im Vergleich zu der Bi-Kultur ohne Endothelzellen. Auch die Stoßwellen-Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Tenascin-Verteilung (Abbildung 68).



**Abbildung 68: Immunhistochemische Tenascin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Tenascin diente dem Nachweis der Ausbildung der extrazellulären Matrix und dem indirekten Nachweis von Fibroblasten. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

**3.6.2 Versorgung des Epithels des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo***  
Für die Untersuchung der Ausbildung und des Erhalts des Epithels der Mundschleimhaut-Äquivalente *in ovo*, wurden die Mundschleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (HDMEC oder ECFC) und Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen an Kulturtag 12 oder an Kulturtag 33 auf die CAM überführt. Nach der Entnahme von der CAM wurde bei den besiedelten Kollagenmatrices Involucrin (vollständig differenzierte Epithelzellen), Zytokeratin 13 (intermediär differenzierte Epithelzellen), Zytokeratin 19 (undifferenzierte Epithelzellen), sowie Occludin (Bestandteil von *Tight junctions*) immunhistochemisch gefärbt.

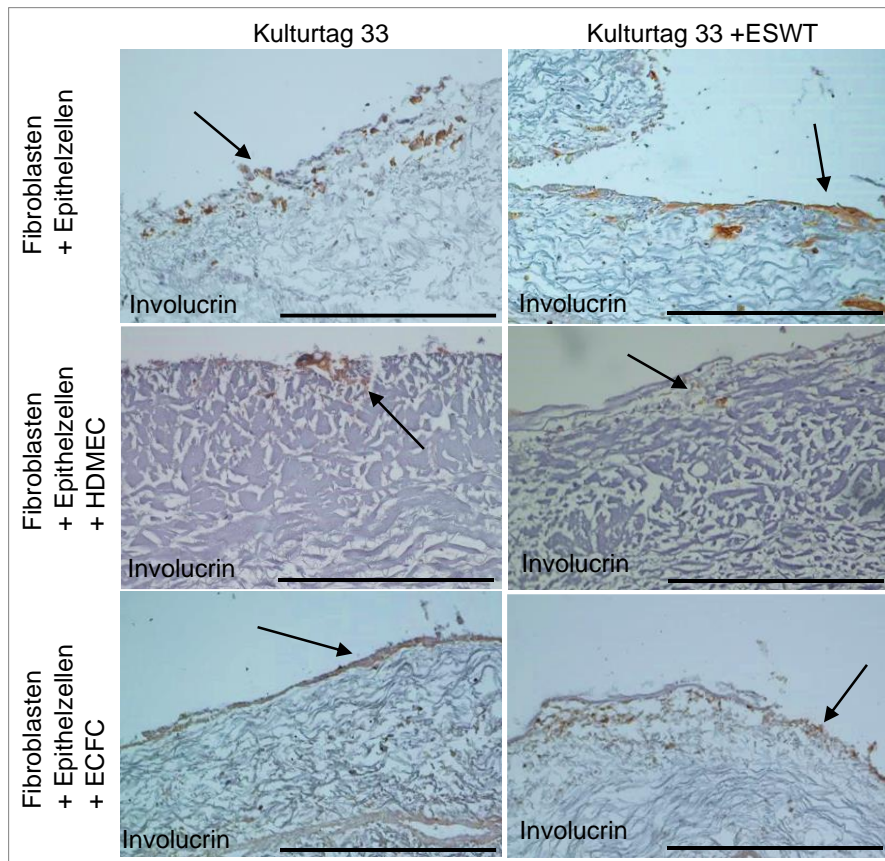
Bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, waren nur vereinzelt Epithelzellen Involucrin-positiv. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC waren deutlich mehr Zellen Involucrin-positiv (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Immunhistochemische Involucrin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Involucrin wurde als Marker für ausdifferenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Involucrin-positiv. Bei den Bi-Kulturen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, zeigte sich eine deutlich stärkere Involucrin-Färbung der Epithelzellen. Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren ebenfalls einige Epithelzellen Involucrin-positiv. Bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit ECFC

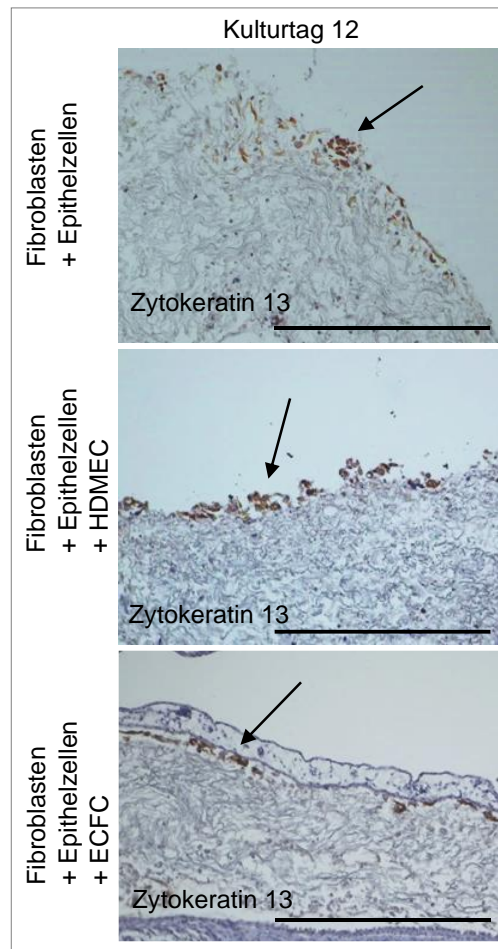
lagen die Involucrin-positiven Epithelzellen in einer durchgehenden Schicht vor. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC führte die Stoßwellen-Behandlung zu keiner stärkeren Involucrin-Ausbildung (Abbildung 70).



**Abbildung 70: Immunhistochemische Involucrin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Involucrin wurde als Marker für ausdifferenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

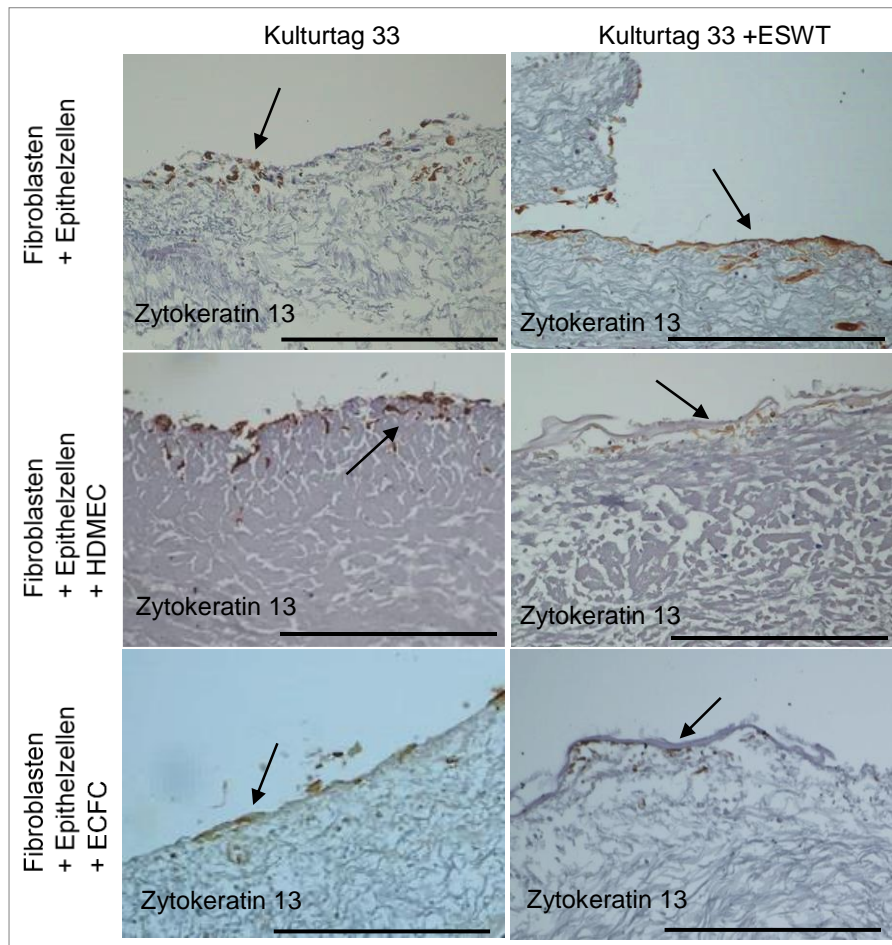
Bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Zytokeratin 13-positiv. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC zeigten die Epithelzellen eine ähnliche Zytokeratin 13-Ausprägung wie in der Bi-Kultur (Abbildung 71).





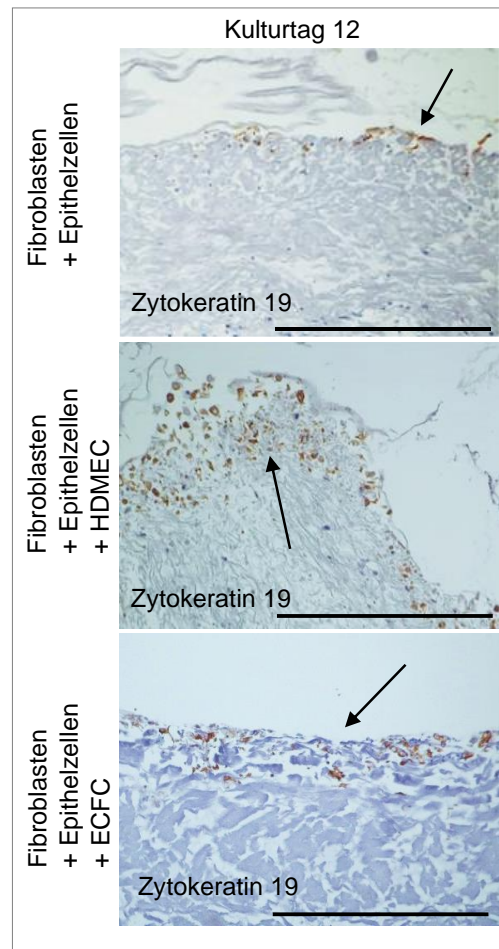
**Abbildung 71: Immunhistochemische Zytokeratin 13-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Zytokeratin 13-positiv. Die Stoßwellen-Behandlung der Bi-Kulturen führte zu einer deutlich stärkeren Zytokeratin 13-Ausprägung in einer durchgehenden und breiten Schicht auf der Kollagenmatrix. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, war die Zytokeratin 13-Ausprägung stärker als bei der Bi-Kultur. Die Stoßwellen-Behandlung führte bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC zu keiner stärkeren Zytokeratin 13-Ausprägung (Abbildung 72).



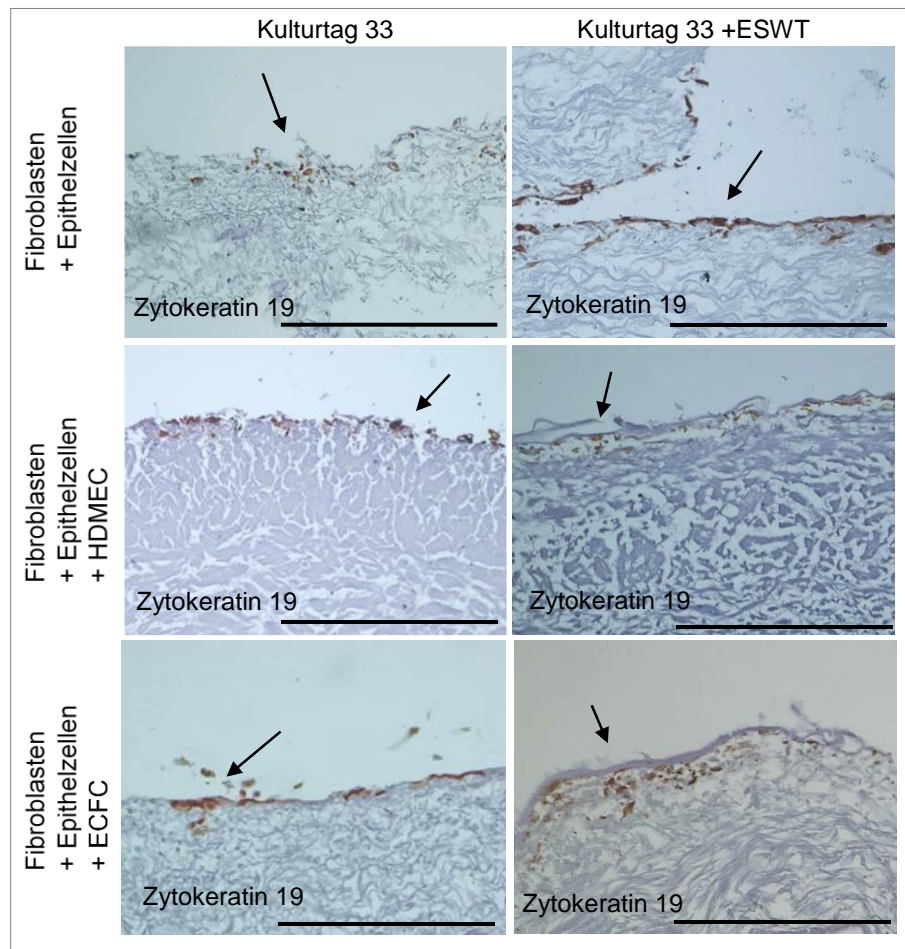
**Abbildung 72: Immunhistochemische Zytokeratin 13-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Zytokeratin 13 wurde als Marker für intermediär differenzierte Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Zytokeratin 19-positiv. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC konnte eine etwas stärkere Zytokeratin 19-Ausprägung der Epithelzellen als bei der Bi-Kultur nachgewiesen werden (Abbildung 73).



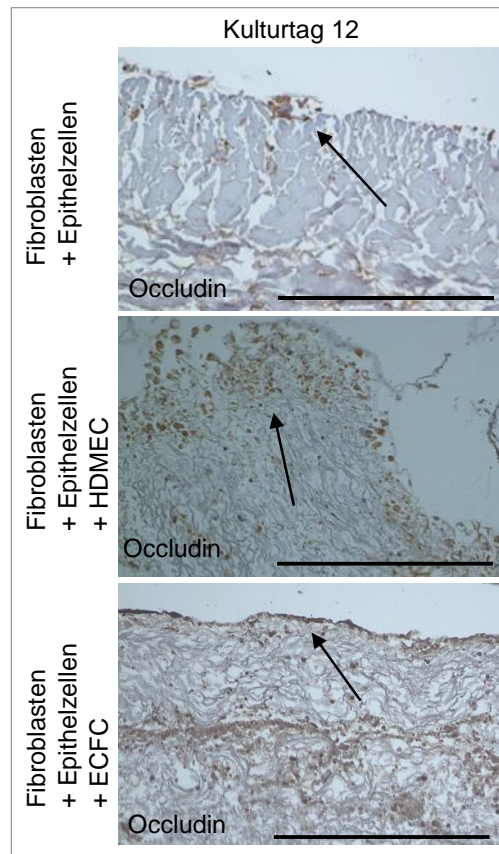
**Abbildung 73: Immunhistochemische Zytokeratin 19-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Zytokeratin 19-positiv. Die Stoßwellen-Behandlung der Bi-Kulturen führte zu einer deutlich stärkeren Zytokeratin 19-Ausprägung in einer durchgehenden und breiten Schicht auf der Kollagenmatrix. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, war die Zytokeratin 19-Ausprägung etwas stärker als bei den Bi-Kulturen. Die Stoßwellen-Behandlung führte bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC zu keiner stärkeren Zytokeratin 19-Ausprägung (Abbildung 74).



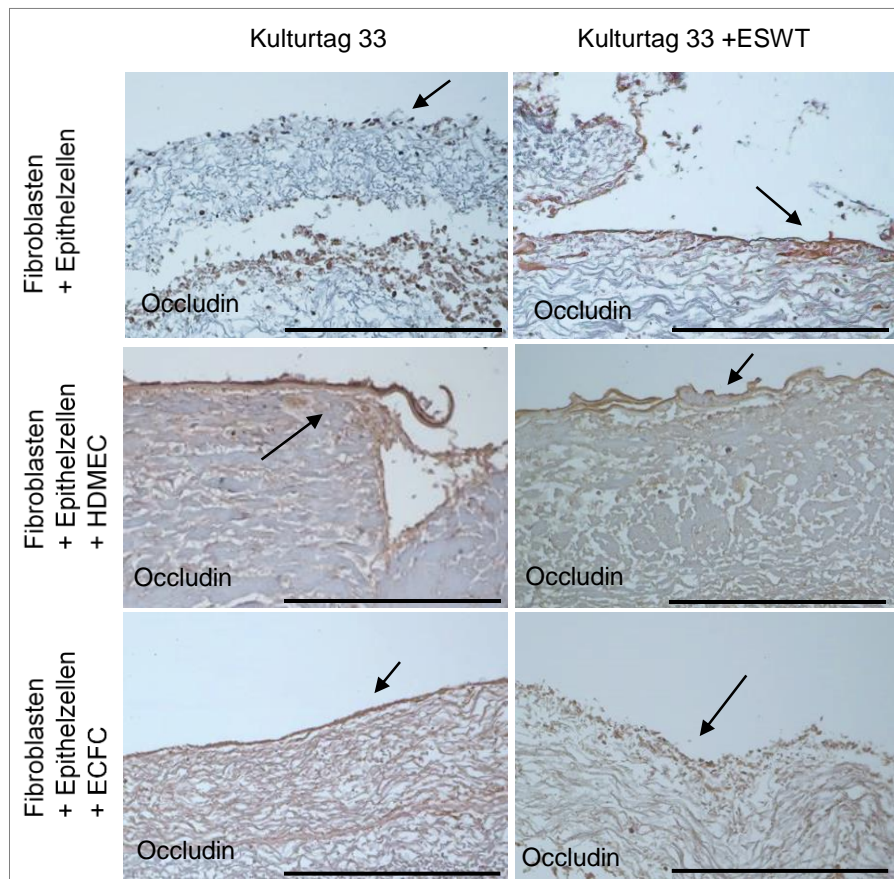
**Abbildung 74: Immunhistochemische Zytokeratin 19-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Zytokeratin 19 wurde als Marker für undifferenzierte, basale Epithelzellen (Pfeile) verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei der Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurde, waren einige Epithelzellen Occludin-positiv. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC konnte eine stärkere Occludin-Ausprägung der Epithelzellen in einer breiteren Schicht der Kollagenmatrix nachgewiesen werden als bei der Bi-Kultur (Abbildung 75).



**Abbildung 75: Immunhistochemische Occludin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Occludin (Pfeile) wurde als Bestandteil von *Tight junctions* zur Analyse der Funktionalität der Epithelzellschichten verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, waren einige Epithelzellen Occludin-positiv. Die Stoßwellen-Behandlung der Bi-Kulturen führte zu einer stärkeren Occludin-Ausprägung in einer durchgehenden und breiten Schicht auf der Kollagenmatrix. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, war die Occludin-Ausprägung stärker als bei den Bi-Kulturen. Die Stoßwellen-Behandlung führte bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC zu keiner stärkeren Occludin-Ausprägung im Vergleich mit den unbehandelten Kollagenmatrices (Abbildung 76).

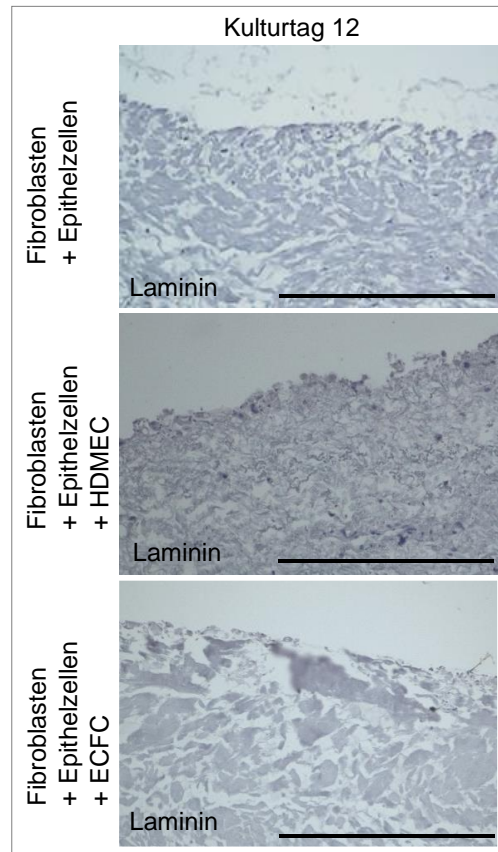


**Abbildung 76: Immunhistochemische Occludin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Occludin (Pfeile) wurde als Bestandteil von *Tight junctions* zur Analyse der Funktionalität der Epithelzellschichten verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.3 Versorgung der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo*

Für die Untersuchung der Ausbildung der Basalmembran der Mundschleimhaut-Äquivalente *in ovo*, wurden die Mundschleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (HDMEC oder ECFC) und Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen an Kulturtag 12 oder an Kulturtag 33 auf die CAM überführt. Nach der Entnahme von der CAM wurde bei den besiedelten Kollagenmatrices die Basalmembranbestandteile Laminin und Kollagen IV immunhistochemisch gefärbt.

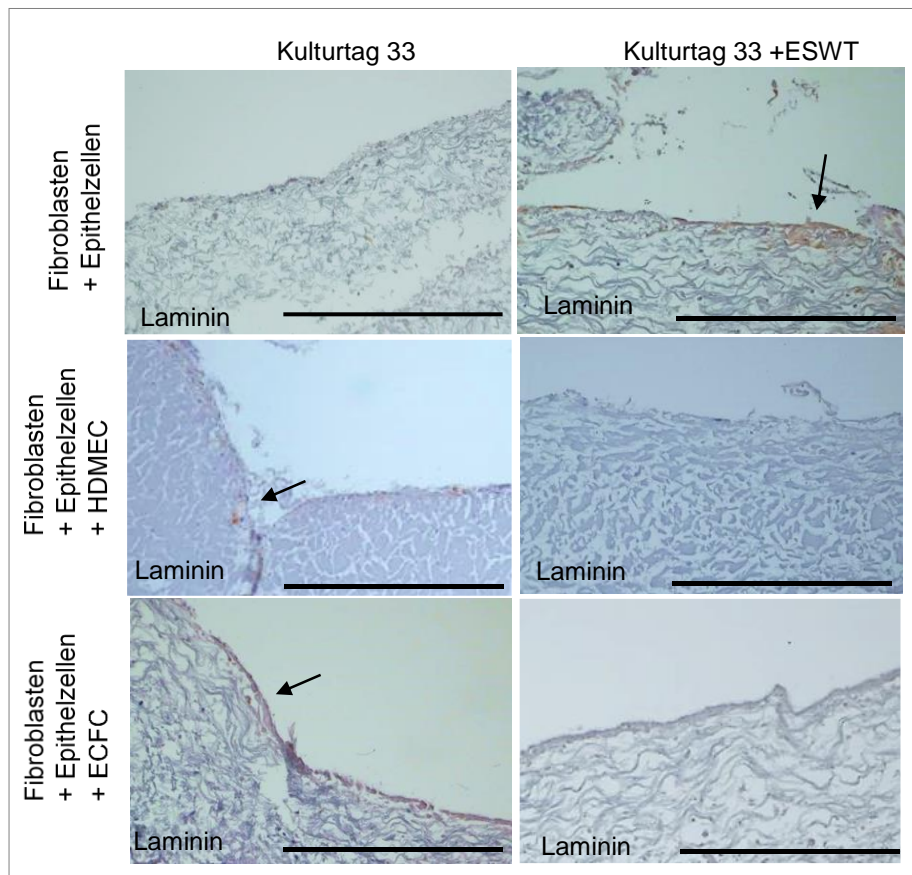
Weder bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, noch bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die ebenfalls an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, konnte Laminin nachgewiesen werden (Abbildung 77).



**Abbildung 77: Immunhistochemische Laminin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Laminin wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zellokklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, konnte kein Laminin nachgewiesen werden. Die Stoßwellen-Behandlung der Bi-Kulturen führte zu einer deutlichen Laminin-Ausprägung in einer breiten Schicht auf der Kollagenmatrix. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, konnte ebenfalls Laminin nachgewiesen werden. Nach der Stoßwellen-Behandlung der Mundschleimhaut-

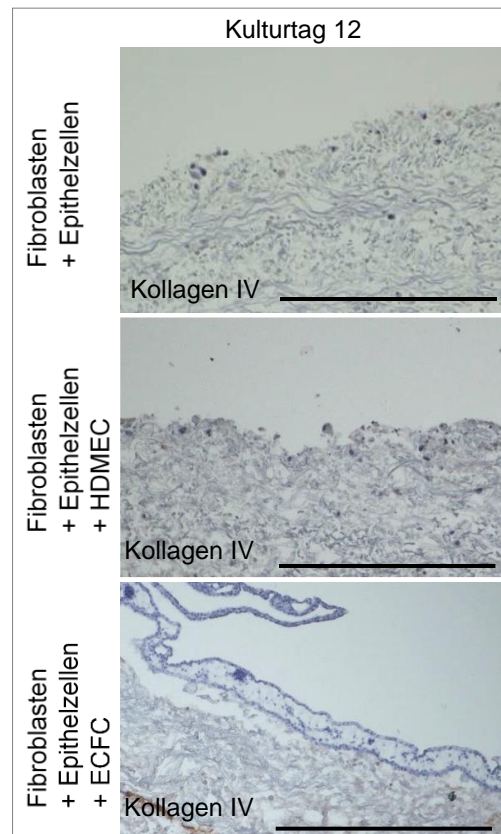
Äquivalente mit HDMEC oder ECFC konnte jedoch kein Laminin nachgewiesen werden (Abbildung 78).



**Abbildung 78: Immunhistochemische Laminin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Laminin (Pfeile) wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

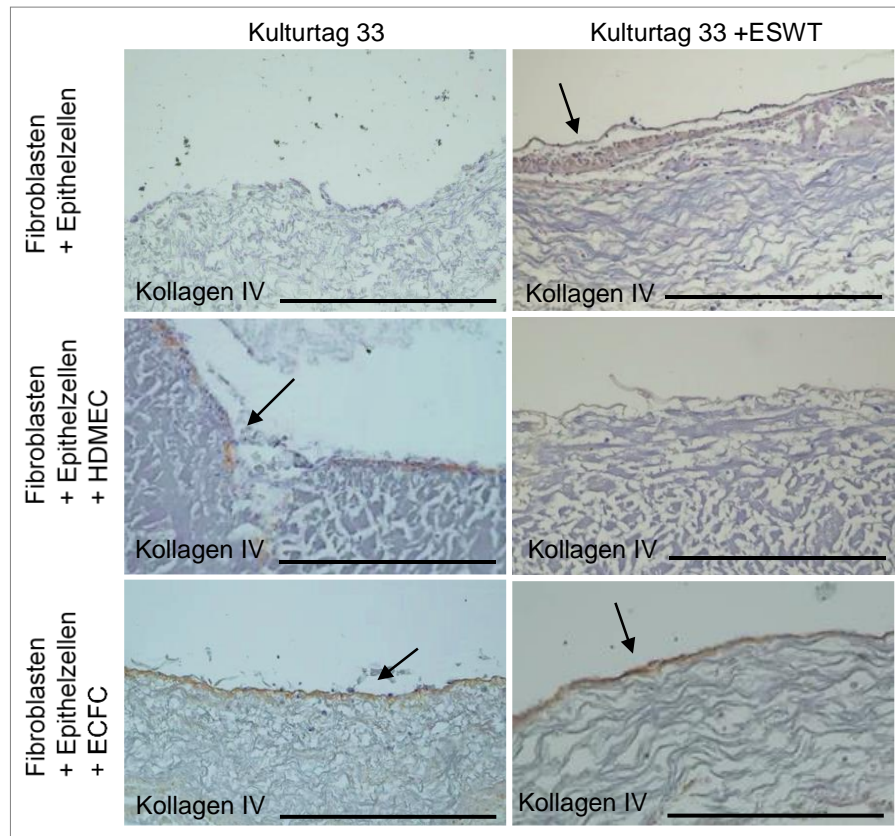
Weder bei den Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, noch bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die ebenfalls an Kulturtag 12 auf die CAM überführt wurden, konnte Kollagen IV nachgewiesen werden (Abbildung 79).





**Abbildung 79: Immunhistochemische Kollagen IV-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12.** Kollagen IV wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 12. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500  $\mu\text{m}$ .

Bei den unbehandelten Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, konnte kein Kollagen IV nachgewiesen werden. Die Stoßwellen-Behandlung der Bi-Kulturen führte zu einer Kollagen IV-Ausprägung. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC, die an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurden, konnte eine starke Kollagen IV-Ausprägung nachgewiesen werden. Nach der Stoßwellen-Behandlung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit HDMEC konnte kein Kollagen IV nachgewiesen werden. Bei den Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC konnte eine ähnliche Kollagen IV-Ausprägung wie bei den unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC nachgewiesen werden (Abbildung 80).



**Abbildung 80: Immunhistochemische Kollagen IV-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.** Kollagen IV (Pfeile) wurde als Bestandteil der Basalmembran als Marker dafür verwendet. Gefärbt wurden Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen, sowie Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC oder ECFC nach dem Aufbringen auf die CAM an Kulturtag 33. Die Kulturen wurden entweder mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 behandelt oder waren unbehandelt. Die abgebildeten Mundschleimhaut-Äquivalente sind mit der glatten, zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert dargestellt. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 500 µm.

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der ECFC aus Vollblut

Die aus dem Vollblut isolierten Endothelzellen wurden zunächst näher charakterisiert. Im Blut zirkulieren endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*; EPC), die zu adulten Endothelzellen differenzieren können. Die Vorläuferzellen lassen sich unterteilen in frühe und späte EPC (Hur et al. 2004). Die späten EPC werden auch als *endothelial colony forming cells* (ECFC) bezeichnet. Diese sind im Gegensatz zu den anderen Untertypen proliferationsfähig und in der Lage Gefäßstrukturen auszubilden (Critser and Yoder 2010; Tasev et al. 2016). Somit eignen sich die ECFC als einzige Gruppe unter den EPC als endotheliale Quelle für die Prävaskularisierung bei der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents aus autologen Zellen.

Am ersten Tag nach der Zellisolation aus der Vollblutspende waren viele adhärenente Zellen auf der Zellkulturplatte vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt wiesen bisher nur wenige Zellen CD31 auf ihrer Oberfläche auf. Mit der Zeit lösten sich einige Zellen und die Population an adhärenenten Zellen verringerte sich. Bei den adhärenenten Zellen stieg jedoch der Anteil an CD31-positiven Zellen an. Da CD31 von allen endothelialen Zellen auf der Zelloberfläche ausgeprägt wird (Lertkiatmongkol et al. 2016; Medina et al. 2017), konnte angenommen werden, dass es sich bei diesen isolierten Zellen um endotheliale Vorläuferzellen handelte. Bis zu Tag 7 nach der Isolation besaß der Großteils der isolierten, adhärenenten Zellen eine spindelförmige Morphologie. In der Literatur ist beschrieben, dass frühe und späte EPC eine unterschiedliche Zellmorphologie aufweisen und, dass die frühe EPC dabei eine Spindel-artige Morphologie und die späte EPC eine Kopfsteinpflaster-Morphologie besitzen. Die frühen EPC sollen diese Morphologie in den ersten zwei bis drei Wochen nach der Zellisolation aufweisen und danach absterben (Hur et al. 2004). Die Morphologie des Großteils der isolierten, adhärenenten Zellen bis zu Tag 7 nach der Isolation deutete darauf hin, dass es sich bei den vorhandenen Zellen hauptsächlich um frühe EPC handelte. Etwa 10 Tage nach der Zellisolation bildeten sich die ersten Zellkolonien aus, welche für ECFC charakteristisch sind (Smadja et al. 2019). Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich nur ein schwacher CD31-Nachweis bei den Zellen. Danach nahm die Anzahl der Zellen zu und adulte Endothelzellen, die sich morphologisch deutlich von den Zellen davor unterscheiden ließen, waren erkennbar. Die Zellen zeigten eine Kopfsteinpflaster-Morphologie, was charakteristisch für ECFC sowie adulte

Endothelzellen ist (Hur et al. 2004). Die Anzahl der CD31-positiven Zellen nahm über die Zeit hinweg zu. Dies ließ sich aufgrund der Proliferationsfähigkeit der gewünschten ECFC erklären.

CD14 ist ein Marker für Zellen mit monozytärem Ursprung, wie zum Beispiel Monozyten und Makrophagen (Zamani et al. 2013). Frühe EPC können der monozytärer Abstammung zugeordnet werden und prägen ebenfalls CD14 aus (Fernandez et al. 2000; Raemer et al. 2009). Innerhalb der ersten Tage nach der Isolation waren die Zellen, die CD31 auf ihrer Oberfläche nachwies, gleichzeitig CD14-positiv. 28 Tage nach der Zellisolation war bei den CD31-positiven Zellen kein CD14 mehr vorhanden. Dies entsprach der Erwartung, dass frühe EPC CD14 ausprägen und ECFC wiederum nicht (Medina et al. 2017). Es bestärkte, dass es sich bei den isolierten Zellen in den ersten Tagen um frühe EPC handelte, und zu späteren Zeitpunkten um späte EPC, also ECFC.

Aufgrund der Anhaltspunkte, wie die Zellmorphologie, die Proliferationsfähigkeit sowie die CD31- und CD14-Analyse, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen aus dem Vollblut nach vier Wochen um ECFC handelte.

#### 4.2 Gefäßbildung innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents während der *in vitro*-Herstellung

Die Ausbildung von Gefäßstrukturen innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents ist für die Funktionalität des Gewebes von großer Bedeutung. Die *in vitro*-Ausbildung von Gefäßstrukturen in Gewebe-Äquivalenten vor einer Transplantation *in vivo* wird als Prävaskularisierung bezeichnet. Die Gefäßstrukturen der Prävaskularisierung können einen funktionalen Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängerorganismus finden (Mishra et al. 2016). Somit ist die Prävaskularisierung während der *in vitro*-Herstellung für die Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung des Mundschleimhaut-Äquivalents und dessen Funktionalität nach der Transplantation in den Empfängerorganismus von maßgeblichem Vorteil. Das Mundschleimhaut-Äquivalent wurde aus einer Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen sowie Endothelzellen auf einer Kollagenmatrix erzeugt. Die Gefäßstrukturen sollten von den Endothelzellen ausgebildet werden. Diese wurden dem Mundschleimhaut-Äquivalent während des Herstellungsprozesses an Kulturtag 12 hinzugegeben.

An Kulturtag 26 innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents hatten sich bereits Gefäßstrukturen in den Kollagenmatrices mit Bi-Kulturen aus Fibroblasten und HDMEC, sowie in den Kollagenmatrices mit Tri-Kulturen aus Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen ausgebildet. Diese Gefäßstrukturen waren oberflächlich auf der porösen Seite der Kollagenmatrix, der gegenüberliegenden Seite des Epithels, lokalisiert. Innerhalb einer zweidimensionalen Zellkultur, in einem Tube Formation Assay auf Matrigel®, bilden Endothelzellen nach 4 h Zusammenschlüsse, sogenannte Tubes, die auf ihre Fähigkeit zur Gefäßbildung schließen lassen (Staton et al. 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Gefäßstrukturen auch in einem komplexeren dreidimensionalen Konstrukt in der Kollagenmatrix im Rahmen einer Bi- und Tri-Kultur mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) nach 14 Tagen ausbilden. Die Endothelzellen sind dabei bis Kulturtag 26 nicht in tiefere Bereiche der Kollagenmatrix migriert, sondern haben sich auf der Oberfläche festgesetzt und dort Gefäßstrukturen ausgebildet. Im Bereich des *Tissue Engineerings* werden Gefäßstrukturen mit einem maximalen Durchmesser des Gefäßlumens von 100 µm als mikrovaskuläre Strukturen bezeichnet (Tien 2019). Die im Mundschleimhaut-Äquivalent von HDMEC ausgebildeten Gefäßstrukturen besitzen einen Lumen-Durchmesser von 10 bis 30 µm (Heller et al. 2016). Somit hatten sich bis Kulturtag 26 in einem oberflächlichen Bereich der porösen Seite der Kollagenmatrix mikrovaskuläre Gefäßstrukturen ausgebildet.

An Kulturtag 33 innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents waren die Gefäßstrukturen in den Kollagenmatrices mit Bi-Kulturen aus Fibroblasten und HDMEC, sowie mit Tri-Kulturen aus Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen besser ausgeprägt als an Kulturtag 26. Außerdem waren die Gefäßstruktur-ausbildenden Endothelzellen an Kulturtag 33 vermehrt vWF-positiv. An Kulturtag 26 war bei deutlich weniger Zellen vWF nachweisbar. Das Glykoprotein vWF wird von Endothelzellen gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der primären Homöostase (Gogia and Neelamegham 2015). Die Bildung und Freisetzung des vWF aus Endothelzellen kann als Maß der Endothelzell-Funktionalität gewertet werden. Das Fehlen der Ausprägung von vWF weist daraufhin, dass die Endothelzellen noch nicht ihre volle Funktion ausgeprägt haben. Es kann somit angenommen werden, dass die Endothelzellen und die ausgebildeten Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 33 funktionaler sind als an Kulturtag 26. Die Gefäßstrukturen konnten an Kulturtag 33 der Mundschleimhaut-Äquivalent-Herstellung etwas tiefer in der Kollagenmatrix

nachgewiesen werden als an Kulturtag 26. Sie waren jedoch weiterhin in einem sehr oberflächlichen Bereich der porösen Seite der Kollagenmatrix lokalisiert. Somit bildete sich das Gefäßstrukturnetz zwischen dem 26. und 33. Kulturtag innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents weiter aus und schien eine leichte Affinität zu besitzen in die Kollagenmatrix einzuwachsen. Eine tiefgehende Prävasikularisierung blieb jedoch aus. In einem Maus-Modell konnte ein Einwachsen von Blutgefäßen in die azelluläre Kollagenmatrix (selbe Kollagenmatrix wie für die Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents verwendet) nach der Transplantation gezeigt werden (Dau et al. 2020). Die Möglichkeit des Einwachsens von Gefäßstrukturen in die Kollagenmatrix, welches *in vitro* nicht stattgefunden hat konnte somit *in vivo* gezeigt werden und sollte auch für die Prävasikularisierung möglich sein.

Aufgrund des besser ausgebildeten Gefäßstrukturnetzes an Kulturtag 33, dessen Endothelzellen funktionaler waren, sowie tiefer im Mundschleimhaut-Äquivalent lokalisiert waren im Vergleich zu den Gefäßstrukturen an Kulturtag 26, eignete sich die Kultivierungsdauer des Mundschleimhaut-Äquivalents von 33 Tage besser als eine Dauer von 26 Tagen. Da das Mundschleimhaut-Äquivalent eine Dicke von etwa 500 µm aufweist und nach einer Transplantation *in vivo* die Diffusionsgrenze für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in Geweben bei etwa 200 µm liegt (Torres Filho et al. 1994), könnte sich ohne eine tiefgehende Prävasikularisierung nach der Transplantation ein unterversorgter nekrotischer Kern im Gewebe-Äquivalent bilden, der zum Absterben des Epithels und zur Abstoßung des Transplantats führen kann (Tien 2019). Für eine zukünftige *in vivo*-Anwendung ist es somit unerlässlich die Gefäßstrukturen tiefer in das Mundschleimhaut-Äquivalent, in Richtung der glatten, zelloklusiven Seite einzubringen, um die Versorgung des Epithels *in vivo* und damit das Überleben und die Funktionalität des Gewebe-Äquivalents nach einer Transplantation zu gewährleisten.

#### 4.3 Verhalten der Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent während der *in vitro*-Herstellung

Die Fibroblasten dienen der Ausbildung der extrazellulären Matrix und sind ein wichtiger zellulärer Bestandteil des Bindegewebes (Alberts 2002). Dabei synthetisieren sie das Glykoprotein Tenascin als Bestandteil der extrazellulären Matrix (Taylor et al. 1989). Die Fibroblasten wurden an Kulturtag 1 der Mundschleimhaut-

Äquivalent-Herstellung auf die Kollagenmatrix gegeben. Neben der Ausbildung des Bindegewebes sezernieren sie verschiedene Wachstumsfaktoren und unterstützen damit bekanntermaßen unter anderem die Prävasikularisierung und die Epithelausbildung (Kellouche et al. 2007; Wong et al. 2007).

An Kulturtag 12 innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents konnte die Funktionalität der Fibroblasten zur Ausbildung der extrazellulären Matrix über eine Tenascin-Färbung in oberflächlicheren Bereiche der porösen Seite der Kollagenmatrix nachgewiesen werden. An Kulturtag 26 war Tenascin bereits verteilter im Mundschleimhaut-Äquivalent zu finden und an Kulturtag 33 war Tenascin letztendlich im gesamten Mundschleimhaut-Äquivalent nachweisbar. Dies ließ darauf schließen, dass die Fibroblasten über die gesamten 33 Kulturtag hinweg vital und funktional waren. Es lässt sich vermuten, dass die oberflächliche Besiedelung der Kollagenmatrix mit Fibroblasten ausreichend ist, um nach 33 Kulturtagen ein Bindegewebe auszubilden, welches das gesamte Mundschleimhaut-Äquivalente durchzieht. Die Sekretion von Zytokinen durch die Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent scheint somit über die Kultivierungsdauer hinweg in die Tiefe bis hin zur glatten, zelloklusiven Seite der Kollagenmatrix zu gelangen. Da die Fibroblasten auch Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sezernieren, die zu der Proliferation und Migration der Endothelzellen beitragen, sowie die Vaskulogenese unterstützen (Kellouche et al. 2007; Newman et al. 2011), könnte dies ein Grund dafür sein, dass die Endothelzellen an Kulturtag 33 während der Mundschleimhaut-Äquivalent-Herstellung tiefer lokalisiert und die Gefäßstrukturen besser ausgebildet waren als an Kulturtag 26. Außerdem besitzen die Fibroblasten zusätzlich eine Migrationsneigung, die es ihnen ermöglicht in 3D-Kollagenmatrices hinein zu migrieren (Miron-Mendoza et al. 2008). Dies ermöglicht es ihnen sich innerhalb der 33 Kulturtage in der Kollagenmatrix zu verteilen; anders als bei den Endothelzellen. Die Funktionalität der Fibroblasten sowie die effektive Ausbildung eines Bindegewebes ist bedeutend für die Funktionalität von nativem Mundschleimhaut-Gewebe (Brizuela and Winters 2022) und somit auch innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents zur *in vivo*-Anwendung.

#### 4.4 Ausbildung des mehrschichtigen Epithels und der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents während der *in vitro*-Herstellung

Bei dem Epithel der nativen Mundschleimhaut handelt es sich um ein mehrschichtiges nicht-keratinisiertes Plattenepithel. Die Epithelzellen weisen in den verschiedenen Schichten unterschiedliche Differenzierungsstadien und Oberflächenmarker auf. In der äußersten Schicht befinden sich vollständig differenzierte Epithelzellen, welche Involucrin auf ihrer Oberfläche exprimieren. Darunter befinden sich intermediär differenzierte Zytokeratin 13-exprimierende Epithelzellen. Darunter wiederum befinden sich undifferenzierte, basale Epithelzellen, auf deren Zelloberfläche sich Zytokeratin 19 nachweisen lässt (Banks-Schlegel and Green 1981; Moll et al. 1982; Barrett et al. 1998). Unter der Epithelschicht bildet sich eine Basalmembran aus, die unter anderem aus Laminin und Kollagen IV besteht (Yurchenco 2011). Bei der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents wurde die Kollagenmatrix an Kulturtag 4 auf der glatten, zellokklusiven Seite mit Epithelzellen besiedelt.

Der Differenzierungsmarker Involucrin konnte an Kulturtag 12 innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents zunächst als dünne durchgängige Schicht auf der Oberfläche der glatten, zellokklusiven Seite der Kollagenmatrix nachgewiesen werden. An Kulturtag 26 bis hin zu Kulturtag 33 waren die Involucrin-positiven Zellen, also die vollständig differenzierten Epithelzellen, in einer breiteren Schicht nachweisbar. Sie lagen dabei nicht mehr in einer durchgehenden Schicht, sondern in Clustern vor. Auch Zytokeratin 13 und Zytokeratin 19 (intermediär differenzierte und undifferenzierte Epithelzellen) waren an Kulturtag 12 zunächst auf der Oberfläche der zellokklusiven Seite der Kollagenmatrix als dünnen durchgängige Schicht nachweisbar. Auch diese differenzierten und undifferenzierten Epithelzellen waren an Kulturtag 26 bis hin zu Kulturtag 33 in einer breiteren Schicht nachweisbar. Dabei lagen sie ebenfalls in Clustern vor. Es ist bekannt, dass sich teilende Epithelzellen in Clustern auftreten und dies eher in tieferen Schichten als in oberen Schichten eines Epithels der Fall ist (Squier and Brogden 2013). Die Funktionalität des mehrschichtigen Epithels konnte über einen Nachweis von Occludin als Bestandteil von *Tight junctions* beurteilt werden (van Rensburg 1995; Feldman et al. 2005). An Kulturtag 12 konnte lediglich eine geringe Ausprägung von *Tight junctions* auf der Oberfläche des Mundschleimhaut-Äquivalents nachgewiesen werden. Somit wies die durchgängige, dünne Schicht von Epithelzellen an Kulturtag 12 eine geringe



Funktionalität auf. Der Gehalt an *Tight junctions* nahm von Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 zu, was auf die Steigerung der Funktionalität des Epithels über die Kultivierungszeit hindeutete. An Kulturtag 33 waren ausgeprägte Bereiche mit *Tight junctions* in einer breiten Schicht auf der glatten, zelloklusiven Seite des Mundschleimhaut-Äquivalents vorhanden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung und Ausbildung des mehrschichtigen Epithels von Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 stattfanden.

Der Basalmembran-Bestandteil Laminin konnte an Kulturtag 12 und an Kulturtag 26 innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents nicht nachgewiesen werden. Erst an Kulturtag 33 ließ sich Laminin innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents nachweisen. Dies deutet daraufhin, dass sich an Kulturtag 12 und Kulturtag 26 noch keine Basalmembran ausgebildet hatte. Der Basalmembran-Bestandteil Kollagen IV war ohne eine zusätzliche Stimulation zu keinem Zeitpunkt innerhalb der Kultivierungsdauer von 33 Tagen im Mundschleimhaut-Äquivalent nachweisbar. Die Ausbildung der Basalmembran innerhalb der *in vitro*-Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents war somit noch nicht erfolgreich und muss angeregt werden. Die Synthese von Kollagen IV geht von differenzierten Epithelzellen und nicht von undifferenzierten Epithelzellen aus (Kirkland and Henderson 2001). Die Stimulation der Epithelzelldifferenzierung könnte somit die Expression von Kollagen IV und damit die Ausbildung der Basalmembran im Mundschleimhaut-Äquivalent fördern.

Wie bei dem *in vitro*-Prozess der Prävasikularisierung war eine Kultivierungsdauer des Mundschleimhaut-Äquivalents von 33 Tagen für die Ausbildung des Epithels besser geeignet als eine Kultivierungsdauer von 26 Tagen. Das erzeugte Epithel mit seinen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befindlichen Epithelzellen und den funktionalen Zell-Zell-Interaktionen bietet eine gute Grundlage für ein funktionales Mundschleimhaut-Äquivalent für eine zukünftige *in vivo*-Anwendung. Die Ausbildung des mehrschichtigen Epithels und besonders die Ausbildung der Basalmembran sollte während der *in vitro*-Herstellung weiter optimiert und unterstützt werden, um die Funktionalität des Mundschleimhaut-Äquivalents zu gewährleisten.

## 4.5 Parakrine Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents

Um ein besseres Verständnis für die Interaktion zwischen den drei verschiedenen Zelltypen innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents, sowie für die Prozesse der Prävasikularisierung und der Epithelausbildung zu erhalten, wurde die Sekretion von Zytokinen durch das Mundschleimhaut-Äquivalent analysiert. Dabei wurde die Sekretion von Tri-Kulturen mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen mit der von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC auf der Kollagenmatrix verglichen, um vor allem den Einfluss der Epithelzellen auf die Zytokin-Sekretion im Mundschleimhaut-Äquivalent zu betrachten.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil an Zytokinen von der Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen auf der Kollagenmatrix deutlich geringer sezerniert wurde als von der Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC. Innerhalb der parakrinen Kommunikation zwischen den Epithelzellen und den anderen beiden Zelltypen schien es zu einer Herunterregulierung verschiedenster Signalwege zu kommen. Die Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent beeinträchtigten dabei die Zytokin-Sekretion der anderen Zelltypen. Welche Mechanismen dem zu Grunde lagen ist noch unklar. Um diese aufzudecken, müssen weitere Analysen der parakrinen Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents folgen. Das Kultivierungssystem der Mundschleimhaut-Äquivalente als Tri-Kultur beinhaltete durch die Zugabe der Epithelzellen zwei Drittel mehr Zellen als das Kultivierungssystem mit Bi-Kulturen. Die höhere Gesamtzellzahl bei der Tri-Kultivierung bei gleichem Zellkulturmedium-Volumen führte möglicherweise durch das reduzierte Nährstoffangebot zu zellulären Stress, welcher zu einer erniedrigten Zytokin-Produktion und -Sekretion geführt haben könnte. Ein Hinweis für ein höheres Level an Zellstress in der Tri-Kultur als in der Bi-Kultur ist die geringere Sekretion von eNOS während der Tri-Kultivierung, welche durch die Erhöhung von oxidativem Stress verursacht werden kann (Łuczak et al. 2020). Eine ähnliche Beobachtung wurde in einem Rattenmodell gemacht, bei dem die Tiere psychologischem Stress ausgesetzt wurden. Dies bewirkte zellulären Stress, der in einer veränderten Zytokin-Produktion resultierte, bei der Zytokine stressbedingt geringer oder stärker sezerniert wurden (Himmerich et al. 2013). Allerdings bezog sich diese Beobachtung auf Abläufe in der physiologischen Umgebung *in vivo* und kann nicht auf das Tri-Kulturmodell übertragen werden. Im

Tiermodell spielen Faktoren, wie Hormone und Immunzellen, wie Makrophagen und Monozyten, eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Zellstress. Diese Faktoren sind im Tri-Kulturmodell nicht vorhanden. Möglicherweise spielen im Mundschleimhaut-Äquivalent bei Zellstress andere Faktoren eine wichtige Rolle, die über die parakrine Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen vermittelt werden. Dabei könnte einer der Zelltypen durch eine stressbedingt veränderte Sekretion von Zytokinen Einfluss auf einen anderen Zelltyp nehmen. Die resultierenden Mechanismen können in dem Kontext sowohl parakrin als auch autokrin sein. Es wurden zum Beispiel von der Tri-Kultur nur 73 % IL-4 (signifikanter Unterschied), 64 % TGF- $\beta$ , 36 % VEGF oder 27 % EGF (signifikanter Unterschied) im Vergleich zur Bi-Kultur an Kulturtag 33 sezerniert. In der Literatur wird beschrieben, dass IL-4 die Differenzierung von Epithelzellen beeinflussen kann (Jain-Vora et al. 1997). Da eine Differenzierung der Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent während der Kultivierung des Mundschleimhaut-Äquivalents stattfand, schien die verminderte Sekretion von IL-4 und auch die geringere Sekretion weiterer Zytokine darauf keinen maßgeblichen Einfluss zu besitzen. Eventuell könnte eine Beeinträchtigung der Epithelzellen durch die verminderten sezernierten Zytokine bestanden haben, die zu der unzulänglichen Ausbildung der Basalmembran beitrug. Für EGF wird beschrieben, dass der Faktor die Neovaskulogenese stimuliert und die Endothelzell-Proliferation anregt (Buckley et al. 1985; Boonstra et al. 1995). Da sich im Mundschleimhaut-Äquivalent zuverlässig Gefäßstrukturen ausbildeten, schien die deutlich geringere Sekretion von EGF keine Beeinträchtigung der Prävasikularisierung darzustellen. Die Prävasikularisierung war in Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC ebenso gut ausgebildet wie in Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC. In Vorarbeiten zeigte sich auch, dass sich die Prävasikularisierung in einer Bi-Kultur mit Fibroblasten und Endothelzellen ebenfalls nur auf oberflächliche Bereiche der Kollagenmatrix beschränkte (Schulze 2016; Bauer 2018). Auch wenn die verminderte Zytokin-Sekretion innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents keinen maßgeblichen Einfluss auf die Prävasikularisierung sowie die Epithelausbildung besaß, sollte die parakrine interzelluläre Kommunikation und die Herunterregulierung der Zytokine genauer analysiert werden. Die Sekretion der Zytokine VEGF, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), Interleukin-8 (IL-8), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) sowie Angiopoietin-2 wurden im Hinblick auf ihre Sekretion im Verlauf der Mundschleimhaut-Äquivalent-Kultivierung genauer betrachtet.

Bei VEGF handelt es sich um einen angiogenen Wachstumsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Proliferation, der Migration und der Gefäßausbildung von Endothelzellen spielt (Ferrara 2004). Vor der Zugabe der Endothelzellen sezernierten Fibroblasten auf der Kollagenmatrix an Kulturtag 12 eine ähnliche Menge an VEGF wie die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen. Dies lässt vermuten, dass im Mundschleimhaut-Äquivalent die Fibroblasten VEGF sezernierten und die Epithelzellen wiederum nicht. In der Literatur bestätigt sich, dass Fibroblasten VEGF sezernieren (Duffy et al. 2013). Neben Fibroblasten sezernieren noch einige weitere Zelltypen VEGF (Ito et al. 2007). Auch für Keratinozyten aus der Mundschleimhaut oder auch von epithelialen Endometriumzellen wurde beschrieben, dass diese VEGF sezernieren (Nakanishi et al. 2007; Maybin et al. 2011). Dies schien für die Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent gar nicht oder zumindest in keiner messbaren Menge zuzutreffen. Nach der Zugabe der Endothelzellen sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC an Kulturtag 15 eine ähnliche Menge an VEGF im Vergleich zu der VEGF-Sekretion an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen. Dies deutete darauf hin, dass die HDMEC im Mundschleimhaut-Äquivalent ebenfalls kein VEGF sezernierten. Somit wären die Fibroblasten hauptverantwortlich für die Sekretion von VEGF im Mundschleimhaut-Äquivalent. Endothelzellen tragen VEGF-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, aber exprimieren unter physiologischen Bedingungen selbst kein VEGF. Allerdings können Formulierung eines Zellkulturmediums für die *in vitro*-Kultur die VEGF-Expression von Endothelzellen stimulieren, was nicht der Situation *in vivo* entspricht (Thomas 1996; Neufeld et al. 1999). Diese Stimulation zur VEGF-Expression schien von dem für das Mundschleimhaut-Äquivalent verwendeten Zellmedium nicht auf die HDMEC auszugehen. Die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC sezernierte an Kulturtag 15 signifikant weniger VEGF als die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC an diesem Kulturtag. Die VEGF-Sekretion der Bi- und Tri-Kultur blieb mit nicht-signifikanten Schwankungen von Kulturtag 15 bis zum Ende der Kultivierung an Tag 33 konstant. Somit sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC konstant signifikant mehr VEGF als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen. Da die VEGF-Sekretion der Mono-Kultur mit Fibroblasten weder durch die Kokultivierung mit Epithelzellen in Bi-Kultur noch durch die Kokultivierung mit HDMEC in Bi-Kultur beeinflusst wurde, deutete dies darauf hin, dass die parakrine Interaktion von Epithelzellen und HDMEC im Mundschleimhaut-Äquivalent die Sekretion von VEGF, welche vermutlich hauptsächlich von den

Fibroblasten ausging, negativ beeinflusste. Die VEGF-Sekretion von Fibroblasten kann durch die Inhibition von TGF- $\beta$  negativ beeinflusst werden (Noma et al. 2008). Die Analyse der Sekretion von TGF- $\beta$  zeigte, wie bereits genannt, dass in der Tri-Kultur weniger TGF- $\beta$  sezerniert wurde als in der Bi-Kultur. Hier könnte ein möglicher Zusammenhang zur verringerten VEGF-Sekretion bestehen. Welche Mechanismen zu der Herunterregulierung von VEGF bzw. TGF- $\beta$  im Mundschleimhaut-Äquivalent führten ist noch unklar. Trotz der wichtigen Rolle von VEGF auf die Gefäßbildung, wirkte sich die verminderte VEGF-Sekretion nicht auffallend auf die Prävasikularisierung im Mundschleimhaut-Äquivalent aus. In der Literatur konnte ebenfalls ein positiver Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Epithelzellen beschrieben werden (Villegas et al. 2005). Die niedrigere VEGF-Konzentration innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents könnte somit eventuell eine weitere mögliche Beeinträchtigung der Ausbildung einer Basalmembran durch die Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent darstellen.

Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC sezernierte an Kulturtag 15 ebenfalls mehr VEGF als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC. Die VEGF-Sekretion der Bi- und Tri-Kultur mit ECFC anstatt HDMEC blieb ebenfalls mit leichten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung konstant. Die Differenz der Menge des sezernierten VEGF zwischen Bi- und Tri-Kultur war geringer als bei den Kulturen mit HDMEC als Endothelzellquelle. Somit sorgte die Kokultivierung von ECFC und Epithelzellen ebenfalls für eine Herunterregulierung der VEGF-Sekretion der Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent. Diese Herunterregulierung fiel allerdings schwächer aus als mit HDMEC. Die ECFC waren im Mundschleimhaut-Äquivalent ebenfalls in der Lage eine Prävasikularisierung auszubilden. Zwischen der Verwendung von HDMEC und ECFC als Endothelzellen, besteht somit kein wesentlicher Unterschied im Hinblick auf die VEGF-Sekretion innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents.

Der Wachstumsfaktor bFGF trägt zur Migration, zur Differenzierung und zur Gefäßausbildung von Endothelzellen bei (Yun et al. 2010). Es ist ebenfalls bekannt, dass sich bFGF positiv auf die Proliferation von Epithelzellen auswirken kann (Hu et al. 2009). Fibroblasten in Mono-Kultur auf der Kollagenmatrix sezernierten an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen signifikant weniger bFGF als die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen zu diesem Zeitpunkt. Es ist bekannt, dass humane

Fibroblasten aus der Haut auch bFGF exprimieren (Root and Shipley 1991). Des Weiteren ist über Brustepithelzellen bekannt, dass diese ebenfalls bFGF exprimieren (Li and Shipley 1991). Zum einen wäre möglich, dass die bFGF-Sekretion der Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent durch die Kokultivierung mit den Epithelzellen stimuliert wurde. Zum anderen wäre es möglich, dass die Epithelzellen den Großteil der bFGF-Menge im Überstand des Mundschleimhaut-Äquivalents sezernierten. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC signifikant weniger bFGF als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC. Somit wurde die bFGF-Sekretion im Mundschleimhaut-Äquivalent nicht wie andere Zytokine herunterreguliert oder gehemmt, sondern durch die Kultivierung mit den Epithelzellen gesteigert. Die Untersuchungen der Zytokin-Veränderungen in Ratten bei Stress zeigten, dass es neben der stressbedingten Herunterregulierung von Zytokinen auch zu einem stressbedingten Anstieg von Zytokin-Leveln im Serum kommen kann (Himmerich et al. 2013). Am Ende der Kultivierung an Tag 33 war die bFGF-Sekretion der Bi-Kultur im Vergleich zu der Sekretion an Kulturtag 15 gesunken. Die bFGF-Sekretion der Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC sank ebenfalls nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 deutlich ab, so dass die bFGF-Konzentration im Überstand der Tri-Kultur am letzten Kulturtag ähnlich niedrig war wie die bFGF-Konzentration im Überstand der Bi-Kultur. Somit wurde bei der Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC zunächst mehr bFGF sezerniert als bei der Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC, wobei die bFGF-Sekretion der Tri-Kulturen ab Kulturtag 12 bis Kulturtag 33 konstant abnahm. Es wird in der Literatur beschrieben, dass die bFGF-Sekretion auch von TGF- $\beta$  beeinflusst werden kann (Jones et al. 1999). Da TGF- $\beta$  in der Tri-Kultur weniger sezerniert wurde als in der Bi-Kultur, könnte dies in einem Zusammenhang mit der abfallenden bFGF-Konzentration im Mundschleimhaut-Äquivalent über die Kultivierungsdauer stehen. Des Weiteren ist bekannt, dass hohe Konzentrationen von bFGF für eine Epithelzell-Differenzierung und niedrige Konzentrationen von bFGF für eine Epithelzell-Proliferation verantwortlich sind (Wang et al. 2017). Ein weiterer Grund für die anfänglich höhere und dann stetig abnehmende Sekretion von bFGF der Tri-Kultur könnte somit sein, dass die Epithelzellen hauptverantwortlich für die bFGF-Sekretion im Mundschleimhaut-Äquivalent waren und diese in noch geringen Differenzierungsstadien mehr, mit zunehmender Differenzierung jedoch weniger bFGF sezernieren.

Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC sezernierte an Kulturtag 15 weniger bFGF als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC. Die bFGF-Sekretion der Bi-Kultur und der Tri-Kultur sank danach bis zum Kulturende an Tag 33 auf ein ähnliches Level ab. Bei den Kulturen mit ECFC anstelle von HDMEC zeigte sich somit eine ähnliche bFGF-Sekretion innerhalb der Kultivierung des Mundschleimhaut-Äquivalents.

IL-8 kann dazu beitragen die Neovaskulogenese zu stimulieren (Yoshida et al. 1997) und somit auch einen Einfluss auf die Prävascularisierung haben. Fibroblasten auf der Kollagenmatrix sezernierten an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen eine ähnliche Menge an IL-8 wie die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC eine ähnliche Menge an IL-8 wie die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC. Die IL-8-Sekretion der Bi- und Tri-Kultur blieb mit minimalen nicht signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung an Tag 33 unverändert. Ein nahezu identisches Sekretions-Muster für IL-8 zeigte sich bei den Bi- und Tri-Kulturen mit ECFC anstelle von HDMEC. Dies lässt annehmen, dass die Fibroblasten für die IL-8-Sekretion im Mundschleimhaut-Äquivalent verantwortlich waren und diese Sekretion über die Kultivierungsdauer hinweg konstant blieb. Es ist bekannt, dass Fibroblasten IL-8 sezernieren (Dunlevy and Couchman 1995). In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass auch Epithelzellen und Endothelzellen IL-8 sezernieren (Eckmann et al. 1993). Dies schien bei den Endothelzellen und Epithelzellen innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents nicht der Fall zu sein oder zumindest keinen messbaren Einfluss zu besitzen. Des Weiteren wurden die IL-8-Sekretion der Fibroblasten innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents nicht durch die Tri-Kultivierung mit Epithelzellen und Endothelzellen beeinträchtigt. Die Verwendung der ECFC im Mundschleimhaut-Äquivalent anstelle der HDMEC wirkte sich hinsichtlich der IL-8-Sekretion nicht unterschiedlich aus.

Das Enzym eNOS spielt bei der Endothelzellsprossung eine wichtige Rolle (Heiss et al. 2015). Des Weiteren wird vermutet, dass ein funktionaler Einfluss von eNOS auf die Epithelzellen besteht. Genaue Funktionen sind allerdings unbekannt (Ortiz and Garvin 2003). Die Fibroblasten auf der Kollagenmatrix sezernierten an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen weniger eNOS als die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen zu diesem Zeitpunkt. Da beschrieben ist, dass Fibroblasten und auch

Epithelzellen eNOS exprimieren (German et al. 2000; Jiang et al. 2008), könnte vermutet werden, dass entweder die Epithelzellen einen positiven Einfluss auf die eNOS-Sekretion der Fibroblasten besaßen oder die Epithelzellen einen großen Teil des eNOS-Anteils im Mundschleimhaut-Äquivalent sezernierten. An Kulturtag 15 sezernierten die Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC mehr eNOS als die Fibroblasten an Kulturtag 12. Durch die Zugabe der Endothelzellen nahm die eNOS-Sekretion somit zu. Das deckt sich mit der Literatur die beschreibt, dass eNOS ebenfalls von Endothelzellen exprimiert wird (Heiss et al. 2015). Des Weiteren sezernierte die Bi-Kultur an Kulturtag 15 mehr eNOS als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC zu diesem Zeitpunkt. Die eNOS-Sekretion nahm somit durch die Kokultivierung der Epithelzellen mit HDMEC ab. Ein Grund dafür könnte wie bei einigen weiteren Zytokinen vermutet, eine negative Interaktion zwischen den Epithelzellen und den HDMEC sein. Die eNOS-Sekretion der Bi- und Tri-Kulturen mit HDMEC blieb mit nicht-signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC weiterhin mehr eNOS als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen zu diesem Zeitpunkt. Somit kann angenommen werden, dass Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC im Mundschleimhaut-Äquivalent eNOS sezernierten und auch diese Zytokin-Sekretion durch die Interaktion zwischen Epithelzellen und Endothelzellen gehemmt wurde. Die zugrunde liegenden Mechanismen dahinter sind noch unklar. Die geringere Menge an sezerniertem und somit für die Zellen verfügbarem eNOS kann auf erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativen Stress zurückzuführen sein. Dies kann zu einer verminderten Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid führen, was wiederum die genannte Endothelzellsprossung beeinträchtigen kann (Łuczak et al. 2020). In geringeren Konzentrationen, sowie sie auch in einer gesunden physiologischen Umgebung vorkommt, sind ROS wichtige Moleküle beispielsweise bei dem Schutz vor Apoptose (Eckers et al. 2012). Die geringere Sekretion von eNOS wirkte sich im Mundschleimhaut-Äquivalent mit einer Tri-Kultur aus Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen nicht auf die Qualität der Prävasikularisierung oder die Epithelausbildung aus.

Die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC sezernierte an Kulturtag 15 etwas mehr eNOS als die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC an diesem Kulturtag. Die eNOS-Sekretion der Bi- und Tri-Kultur mit ECFC anstelle von HDMEC blieb mit



minimalen nicht signifikanten Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung unverändert. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur weiterhin mehr eNOS als die Tri-Kultur. Insgesamt sezernierte das Mundschleimhaut-Äquivalent mit ECFC mehr eNOS als das Mundschleimhaut-Äquivalent mit HDMEC. Eine höhere eNOS-Sekretion konnte auch in Vorarbeiten mit Bi-Kulturen mit Fibroblasten und ECFC im Vergleich zu Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC gezeigt (Bader 2021) und hiermit auch in Tri-Kulturen bestätigt werden. Generell zeigten Mundschleimhaut-Äquivalente mit ECFC die gleiche Tendenz der eNOS-Sekretion wie Mundschleimhaut-Äquivalente mit HDMEC als Endothelzellen.

Angiopoietin-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Akwii et al. 2019). Die Fibroblasten sowie die Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen sezernierten an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen eine nur sehr geringe Menge an Angiopoietin-2. An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC und auch die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC deutlich mehr Angiopoietin-2 als vor der Zugabe der Endothelzellen an Kulturtag 12. Dies deutete darauf hin, dass HDMEC maßgeblich für die Angiopoietin-2-Sekretion im Mundschleimhaut-Äquivalent verantwortlich sind. Passend dazu beschreibt die Literatur die Expression und Sekretion von Angiopoietin-2 durch Endothelzellen (Akwii et al. 2019). Die Bi-Kultur sezernierte dabei mehr Angiopoietin-2 als die Tri-Kultur. Die Angiopoietin-2-Sekretion der Bi-Kultur sank bis zum Ende der Kultivierung konstant ab. Auch die Sekretion der Tri-Kultur sank nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 konstant ab. Am letzten Kulturtag 33 sezernierte die Bi-Kultur immer noch mehr Angiopoietin-2 als die Tri-Kultur. Es wäre denkbar, dass organsiertere Endothelzellen in Gefäßstrukturen weniger Angiopoietin-2 exprimieren und sezernieren als vereinzelte Endothelzellen, die am Anfang der Gefäßausbildung stehen. Es ist belegt, dass die Angiopoietin-2-Konzentration in einer gesunden physiologischen Umgebung geringer ist als in einer entzündlichen oder tumorösen Umgebung (Akwii et al. 2019). Dies bekräftigt die Idee, dass Angiopoietin-2 zu Beginn der Gefäßausbildung stärker sezerniert wird und die Sekretion mit der Zunahme von ausgeprägteren Gefäßstrukturen, wie es im Mundschleimhaut-Äquivalent ab Kulturtag 26 der Fall ist, abnimmt. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, dass auch bei der Angiopoietin-2-Sekretion eine negative Interaktion zwischen den Epithelzellen und den Endothelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent vorhanden war, die zu der

Erniedrigung der Angiopoietin-2-Sekretion führte. Dies wirkte sich jedoch nicht auf die Qualität der Prävascularisierung im Mundschleimhaut-Äquivalent aus.

An Kulturtag 15 sezernierte die Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC sowie die Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC ebenfalls deutlich mehr Angiopoietin-2 als vor der Zugabe der ECFC an Kulturtag 12. Die Angiopoietin-2-Sekretion der Bi-Kultur mit Fibroblasten und ECFC sank bis zum Ende der Kultivierung konstant ab. Auch die Sekretion der Tri-Kultur mit Fibroblasten, ECFC und Epithelzellen sank nach Kulturtag 12 bis hin zu Kulturtag 33 konstant ab. Bei der Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC schienen die Epithelzellen keine negative Auswirkung auf die Angiopoietin-2-Sekretion der ECFC zu besitzen, da die Tri-Kultur eine ähnliche Menge an Angiopoietin-2 sezernierte wie die Bi-Kultur. Insgesamt zeigten sich größere Schwankungen in der Angiopoietin-2-Sekretion innerhalb verschiedener Bi- und Tri-Kultur-Ansätze. Gesamt gesehen sezernierten die Bi- und Tri-Kulturen mit ECFC als Endothelzellen weniger Angiopoietin-2 als die Kulturen mit HDMEC. Durch welche Mechanismen der Unterschied bei der Verwendung von HDMEC oder ECFC zustande kam, ist noch unklar. Diese Abweichung der Ergebnisse der parakrinen Analyse des Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC und des Mundschleimhaut-Äquivalents mit ECFC führte jedoch zu keiner maßgeblichen Beeinträchtigung der Prävascularisierung bzw. der Anwendung der ECFC.

#### 4.6 Optimierung der Prävascularisierung mittels chemotaktischer Reize

Die Gefäßausbildung innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents war zwar erfolgreich, jedoch beschränkte sich diese bisher auf den oberflächlichen Bereich der porösen, der Epithelschicht gegenüberliegenden Seite der Kollagenmatrix. Eine tiefgehende Prävascularisierung wurde angestrebt, um die spätere Versorgung des Epithels nach der Transplantation des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo* zu gewährleisten. Mittels chemotaktischer Reize wurde versucht die Endothelzellen zur Migration in die Kollagenmatrix hinein anzuregen, um dort ebenfalls Gefäßstrukturen auszubilden.

In einer Vorarbeit zeigte VEGF eine chemotaktische Wirkung auf HDMEC (Bauer 2018). In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich VEGF-121 ebenfalls als Chemotaxin für HDMEC und ECFC eignet. Es konnte gezeigt werden, dass

HDMEC und ECFC in der Lage sind in Richtung von VEGF-121 zu migrieren. VEGF-121 ist eine Isoform von VEGF, welche durch alternatives Spleißen entsteht. Dabei fehlen der Isoform die von Exon 6 und 7 kodierten Anteile (Tischer et al. 1991). Es wurde in der Literatur beschrieben, dass, ebenfalls wie VEGF, die Isoform VEGF-121 die Migration von Endothelzellen anregen kann (Dvorak et al. 1995; Pan et al. 2007). Dies konnte somit für HDMEC und ECFC bestätigt werden. Bereits bei einer Konzentration von 5 ng/ml VEGF-121 zeigte sich eine signifikante chemotaktische Migration von HDMEC in der Boyden-Kammer in Richtung VEGF-121. Den Höhepunkt ihrer Migrationsleistung hatten die Zellen bei einer Konzentration von 25 ng/ml VEGF-121 als Lockstoff. Die ECFC zeigten eine schwächere Migrationsaffinität in Richtung VEGF-121 in der Boyden-Kammer als HDMEC. Ein signifikanter Unterschied der Migration im Vergleich zur Kontrolle ohne Lockstoff ergab sich erst bei einer Konzentration von 100 ng/ml VEGF-121. Grund dafür könnte sein, dass die ECFC eine geringere Migrationsaffinität besitzen könnten als HDMEC. Es wäre möglich, dass die im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen vor der Isolation noch eine hohe Migrationsneigung besitzen, da sie durch angiogene Stimuli zu Gefäßschäden migrieren müssen und sie bei der Gefäßheilung differenzieren und danach ihre Migrationsneigung abnimmt. Bei den isolierten Zellen aus dem Blut handelt es sich um bereits differenzierte EPC. HDMEC könnten eine höhere Migrationsneigung besitzen, da sie als mikrovaskuläre Endothelzellen im Gewebe Angiogenese betreiben (Bourland et al. 2019).

Ein Ansatz, um einen chemotaktischen Reiz für die Endothelzellen in die Kollagenmatrix hinein zu erzeugen, war es, in einem Transwell-System unterhalb der Kollagenmatrix, die mit der porösen Seite nach oben gerichtet war, Fibroblasten im Well auszusäen. Fibroblasten sezernieren eine Vielzahl an Zytokinen, von denen einige chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen besitzen (Yoshida et al. 1996; Newman et al. 2011). So wurde zum Beispiel, wie in vorherigen Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt, VEGF und bFGF sezerniert. Zwar ist die sezernierte Menge der Zytokine in diesem chemotaktischen Ansatz nicht definiert und schwankt je nach Spender des Gewebes zur Zellisolation, jedoch könnte durch die adhären, vitalen Fibroblasten unterhalb der Kollagenmatrix im Transwell-System ein langanhaltender Gradient an chemotaktischen Zytokinen für die Endothelzellen auf der Kollagenmatrix erzeugt werden. Die Aussaat der Fibroblasten und die damit einhergehende Sekretion von Zytokinen unterhalb der Kollagenmatrix erzeugte allerdings keinen ausreichenden

chemotaktischen Reiz, der die Endothelzellen dazu veranlasste in tiefere Bereiche der Kollagenmatrix einzuwandern. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Menge der sezernierten chemotaktischen Faktoren zu gering war zur Anregung der Migration. Bei der Analyse der parakrinen Kommunikation innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents zeigte sich, dass Fibroblasten beispielsweise an Kulturtag 12 VEGF zu einer Mediumkonzentration von 4,2 ng/ml und bFGF zu einer Mediumkonzentration von 0,2 ng/ml sezernierten. Als geeignete VEGF-121-Konzentration für die Migration von Endothelzellen in der Boyden-Kammer erwies sich 25 ng/ml bis 100 ng/ml VEGF-121. Mittels der definierten Konzentration von 25 ng/ml oder 100 ng/ml VEGF-121 unterhalb der besiedelten Kollagenmatrix im Transwell-System konnte ebenfalls keine erfolgreiche Migration der Endothelzellen in die Kollagenmatrix hinein erzeugt werden. In der Boyden-Kammer mussten die Endothelzellen durch die Poren einer Membran migrieren. Diese Poren hatten einen Durchmesser von 8 µm und die HDMEC sind in etwa 30 µm groß. Die HDMEC konnten somit nicht passiv durch die Poren gelangen, sondern mussten aktiv durch die Poren migrieren, was ihnen mit einem Anreiz (25 - 100 ng/ml VEGF121) gelang. Die Struktur der Kollagenmatrix schien dabei für die Endothelzellen ein größeres Hindernis dargestellt zu haben, beidem eventuell hauptsächlich der chemotaktische Reiz durch die etwa 500 µm dicke Kollagenmatrix hinweg zu schwach war, um die Migration der Endothelzellen erfolgreich anzuregen.

In einem weiteren chemotaktischen Ansatz wurde ein mit VEGF-121-versetztes Kollagen I-Gel als Unterlage für die zellbesiedelte Kollagenmatrix verwendet. Für diesen Ansatz wurde zunächst eine zeitlich konstante Abgabe von VEGF-121 aus dem Kollagen I-Gel in darüber liegendes Medium erfolgreich nachgewiesen. Innerhalb der ersten drei Stunden diffundierte VEGF zu einer Konzentration von 368 ng/ml in das darüber liegende Medium. Da sich Endothelzellen, die sich in Suspension befinden, zu einem Großteil innerhalb der ersten vier Stunden nach ihrer Aussaat an der Kollagenmatrix festsetzen, stellte dies eine gute Voraussetzung für den darauffolgenden Migrationsversuch dar, bei dem die Endothelzellen auf einer Kollagenmatrix ausgesät wurden, die sich auf dem Kollagen I-Gel befand. Jedoch veranlasste auch dies die Endothelzellen nicht dazu in die Kollagenmatrix hinein zu migrieren. Hier scheint die gleiche Problematik zum Tragen zu kommen, wie bei den anderen beschriebenen Chemotaxis-Ansätzen. Die Struktur der Kollagenmatrix sollte aufgrund der offen porigen Schichtseite aus Kollagenfasern kein Hindernis für die Migration der Endothelzellen darstellen. In einer Studie, bei der die Kollagenmatrix als

azelluläres Transplantat in Ratten transplantiert wurde, konnte zwei Woche später eine homogene Vaskularisierung der kompletten Matrix gezeigt werden (Schwarz et al. 2006). Wohl eher ist die Affinität der Endothelzellen auf dem Kollagen des *Scaffolds* angeheftet zu bleiben höher, als der chemotaktische Reiz des VEGF-121. Endothelzellen adhäreren bevorzugt auf Kollagen-beschichteten Untergründen, mit der Folge einer geförderten Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen und einer erhöhten fokalen Adhäsion (Kang et al. 2016). Zudem scheint der chemotaktische Reiz des VEGF-121 zu schwach zu sein, um durch die Kollagenmatrix an die Endothelzellen zu gelangen und ihre Migration anzuregen.

Es war somit keine Anregung der Endothelzellmigration in die Tiefe der Kollagenmatrix über einen chemotaktischen Gradienten im Transwell-System oder über das Kollagen I-Gel möglich. Ein stärkerer chemotaktischer Gradient, welcher zusätzlich über die Zeit kontrollierbar ist, könnte zu einer Optimierung der Endothelzellmigration führen.

#### 4.7 Optimierung der Prävasikularisierung mittels Nanopartikel

Ein möglichst langfristiger chemotaktischer Gradient könnte mithilfe von Nanopartikeln erzeugt werden, die chemotaktische Faktoren eingekapselt tragen und kontrolliert aufgebrochen werden können, sodass eine konstante Freisetzung dieser Faktoren gewährleistet werden kann. Ziel wäre es die Nanopartikel während der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents an die Kollagenmatrix zu binden und von der glatten, zelloklusiven Seite aus einen chemotaktischen Gradient zu erzeugen, der die Endothelzellen auf der gegenüberliegenden Seite zur Migration in die Kollagenmatrix hinein und zur Epithelseite hin anregt. Als chemotaktischer Lockstoff wurde VEGF-121 gewählt. Die chemotaktische Wirkung von VEGF-121 konnte bereits bestätigt werden. Aufgrund der geringeren Größe der Spleißvariante im Vergleich zu VEGF, eignete es sich zur Einkapselung in die Nanopartikel. VEGF-121 wurde in Stärke- sowie Hydroxyethylstärke (HES)-Nanopartikel eingekapselt, welche mittels  $\alpha$ -Amylase aufgebrochen werden sollten. Um die Freisetzungskinetik der Nanopartikel zu analysieren und Nanopartikelmengen sowie  $\alpha$ -Amylase-Mengen aneinander anzupassen, wurde fluoreszierendes Sulforhodamin-101 (SR-101) in die Stärke- und HES-Nanopartikel eingekapselt und dessen Freisetzung gemessen. Daraufhin wurde die VEGF-121-Freisetzung ermittelt.

Eine kontrollierte Freisetzung von SR-101 aus Stärke- und HES-Nanopartikeln konnte mittels  $\alpha$ -Amylase erzielt werden. Ohne  $\alpha$ -Amylase waren die Stärke-Nanopartikel recht stabil und ließen über 7 d hinweg kaum SR-101 frei. Eine geringe Menge an  $\alpha$ -Amylase von 1,157 U erzielte nur ein schwaches Aufbrechen der Stärke-Nanopartikel und somit nur eine geringe Freisetzung von SR-101. Durch die Verwendung von 11,57 U oder 115,7 U  $\alpha$ -Amylase konnten die Stärke-Nanopartikel erfolgreich aufgebrochen werden, wobei SR-101 über 7 d hinweg freigesetzt wurde. Bei der Verwendung von 11,57 U  $\alpha$ -Amylase war der Großteil des Nanopartikel-Inhaltes nach 12 h freigesetzt. Bei der Verwendung von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase war dies bereits nach 3 h der Fall. Bei der Verwendung von 11,57 U  $\alpha$ -Amylase bei HES-Nanopartikeln war der Großteil des Nanopartikel-Inhaltes nach 24 h freigesetzt und bei der Verwendung von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase nach 3 h. Somit brach der Großteil der HES-Nanopartikel mit der mittleren Menge an  $\alpha$ -Amylase später auf als der Großteil der Stärke-Nanopartikel. Bei Stärke handelt es sich um ein Polysaccharid ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ ) aus  $\alpha$ -D-Glukose-Einheiten (Lovegrove et al. 2017). HES wird künstlich aus Amylopektin hergestellt und hat Hydroxyethylgruppen an den Glukoseeinheiten gebunden (Warren and Durieux 1997). Stärke sowie HES kann durch  $\alpha$ -Amylase zerstört werden (Yoshida and Kishikawa 1984; Sun et al. 2010). Durch die Hydroxyethylglukose-Bindungen werden die HES-Nanopartikel langsamer zerstört als die Stärke-Nanopartikel (Yoshida and Kishikawa 1984).

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Freisetzungskinetik der Nanopartikel mit  $\alpha$ -Amylase unter Schütteln mit und ohne Rührstäbchen verhält. Das Schütteln führte bei den Stärke- sowie HES-Nanopartikel dazu, dass sich die Freisetzungskinetik bei der Verwendung von 11,57 U  $\alpha$ -Amylase und 115,7 U  $\alpha$ -Amylase aneinander anpasste. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Nanopartikel durch das Schütteln der  $\alpha$ -Amylase zugänglicher werden und bereits geringere  $\alpha$ -Amylase-Mengen zu einem ähnlichen Aufbrechen der Nanopartikel führen wie höhere  $\alpha$ -Amylase-Mengen. Die Nanopartikel ohne  $\alpha$ -Amylase-Behandlung waren trotz des Schüttelns stabil und ließen kein SR-101 frei. Das Schütteln mit Rührstäbchen führte unabhängig von einer  $\alpha$ -Amylase-Behandlung zu einer kompletten mechanischen Zerstörung der Stärke- sowie HES-Nanopartikel.

Der kontrollierbare Aufbruch der Nanopartikel und ihre Freisetzungskinetik haben sich als geeignet erwiesen, um für zukünftige Versuche mit dem Mundschleimhaut-

Äquivalent Anwendung bei der Erzeugung eines chemotaktischen Gradienten zu finden. Unterschiedliche Verhältnisse an Stärke- und HES-Nanopartikeln sowie unterschiedliche Mengen an  $\alpha$ -Amylase können verwendet werden, um einen geeigneten Gradienten über die Zeit hinweg zu erzeugen. Durch Schütteln kann dies zusätzlich beeinflusst werden. Eine vollständige Zerstörung der Nanopartikel kann durch eine mechanische Zerstörung mittels Schütteln mit Rührstäbchen erreicht werden. Letztes ist allerdings nicht für eine Anwendung mit dem Mundschleimhaut-Äquivalent geeignet, sondern diene als Erkenntnis beim Aufbrechen der Nanopartikel, welche als Methode zum Freisetzungsversuch von VEGF-121 angewendet werden konnte.

Die Zellviabilität von HDMEC wurde durch die Zugabe der Stärke- sowie HES-Nanopartikel beeinträchtigt. Zwar stieg die Zellviabilität der mit Nanopartikel-behandelten Zellen über 7 d hinweg an, jedoch war sie geringer als bei unbehandelte Zellen. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Verwendung von Stärke- und HES-Nanopartikeln. Das gleiche zeigte sich bei der Wirkung der Nanopartikel auf die Fibroblasten. Die Epithelzellen waren von dieser Beeinträchtigung weniger betroffen. HES steht seit längerer Zeit in der Diskussion einen negativen Einfluss auf die Blutgerinnung und auf Zellen zu besitzen (Warren and Durieux 1997; Zarychanski and Turgeon 2019; Zarbock and Buhre 2022). Insbesondere zeigte sich in *in vitro*-Studien, dass HES einen negativen Einfluss auf die Zellaktivität von Endothelzellen besitzt (Collis et al. 1994). Außerdem ist bekannt, dass eine Behandlung mit HES *in vivo* in einer Patientin oder einem Patienten zu einer allergischen Reaktion zu führen kann (Porter and Goldberg 1986). Die Untersuchung von verschiedenen Stärke-basierten Biomaterialien zeigte eine Biokompatibilität von Stärke für *in vitro*-Zellkulturen auf (Marques et al. 2005). Da die Beeinträchtigung der Zellviabilität der HDMEC, Fibroblasten und Epithelzellen durch die Stärke-Nanopartikel ähnlich ist wie durch die HES-Nanopartikel und diese Beeinträchtigung zudem nicht signifikant ist und den Anstieg der Zellviabilität zulässt, tritt die Vermutung einer maßgeblichen Beeinträchtigung durch HES in den Hintergrund. Bei der Herstellung der Stärke- sowie der HES-Nanopartikel erfolgt eine Redispergierung der Nanopartikel mit einer 0,1% SDS-Lösung mit einer darauffolgenden Aufreinigung. Ein Teil des SDS bleibt in der Nanopartikel-Lösung vorhanden und ist notwendig, damit die Nanopartikel dispergiert bleiben. SDS kann bei Zellen zu einer Inhibierung des Zellwachstums und zur Apoptose führen (Nam C-W et al. 2011). Da es sich um eine nicht signifikante

Beeinträchtigung der Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen handelte und die Nanopartikel in zukünftigen Versuchsansätze an die glatte, zellokklusive Seite der Kollagenmatrix, also gegenüberliegend zu den Endothelzellen und Fibroblasten, gebunden werden sollen, sind die Stärke- und HES-Nanopartikel nach jetzigen Stand für die Anwendung geeignet.

Auch die Zugabe der  $\alpha$ -Amylase, die für die Anwendung der Nanopartikel im Mundschleimhaut-Äquivalent notwendig ist, beeinträchtigte die verschiedenen Zelltypen in ihrer Viabilität. Die Verwendung von 11,5 U  $\alpha$ -Amylase besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität von HDMEC. Die Verwendung von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase hingegen führt bereits 6 h nach der Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gleiches zeigte sich für die Fibroblasten, welche mit  $\alpha$ -Amylase behandelt wurden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch bei den Epithelzellen, wobei der Effekt weniger deutlich war als bei der  $\alpha$ -Amylase-Behandlung von HDMEC und Fibroblasten. Dies lag vermutlich allerdings daran, dass bereits bei den unbehandelten Epithelzellen große Schwankungen in der Viabilität herrschten. Die  $\alpha$ -Amylase scheint in hohen Mengen einen zelltoxischen Einfluss auf humane Zellen zu besitzen. Eine *in vitro*-Toxizität auf neuroepitheliale Zellen ist bekannt (Sasso et al. 2022). Die hohe Menge von 115,7 U  $\alpha$ -Amylase ist somit nicht für die Behandlung der Nanopartikel im Zusammenhang mit dem Mundschleimhaut-Äquivalent geeignet. Die Menge von 11,5 U  $\alpha$ -Amylase kann jedoch für zukünftige *in vitro*-Versuche verwendet werden.

Eine VEGF-121-Freisetzung aus den Stärke- und HES-Nanopartikeln war auf keine Weise zu erzielen, weder durch die Verwendung der ausgetesteten oder einer noch höheren  $\alpha$ -Amylase-Menge, noch durch die mechanische Zerstörung durch das Schütteln mit Rührstäbchen oder Ultraschallbehandlung. Auch nicht durch die Kombination aus all diesen Möglichkeiten. VEGF-121 besitzt Aminogruppen, welche feste Bindungen mit den Glukoseeinheiten der Stärke und der HES eingehen können und somit mit den „Wänden“ der Nanopartikel reagieren (Baschang 1962; Ferrara 1999). Eine Freisetzung ist dann scheinbar unmöglich. Auch eine Migration der HDMEC in Richtung der mittels  $\alpha$ -Amylase oder mechanischer Gewalt aufgebrochenen Stärke- und HES-Nanopartikel mit VEGF-121 konnte nicht erzielt werden. Somit war das an die Nanopartikel gebundene VEGF-121 auch nicht mehr chemotaktisch relevant für die Zellen.



Die Grundvoraussetzungen als Methode zur Erzeugung eines längerfristigen und kontrollierbaren chemotaktischen Gradienten mittels Stärke- und HES-Nanopartikeln innerhalb der Mundschleimhaut-Äquivalent-Herstellung zur tiefgehenden Prävasikularisierung sind gegeben. Um den Einsatz der Nanopartikel für diese Anwendung zu verwirklichen, muss die störende Wechselwirkung der Nanopartikel mit VEGF-121 umgangen werden. Sollte diese Wechselwirkung chemisch und biotechnologisch nicht umgangen werden können, könnten andere Materialien zur Nanopartikel-Herstellung angedacht werden. Die Herstellung von abbaubaren Nanopartikeln aus Ovalbumin, die eine Stoffeinkapselung sowie dessen Freisetzung ermöglichen, ist ebenfalls möglich (Piradashvili et al. 2017). Da es sich bei Ovalbumin allerdings um ein Protein handelt welches beispielsweise mit Trypsin aufgebrochen werden kann bzw. muss (Abeyrathne et al. 2014), ist die Anwendung im zellulären Mundschleimhaut-Äquivalent fraglich. Hier besteht noch Handlungsbedarf für einen vielversprechenden Einsatz von mit Wachstumsfaktoren-beladenen Nanopartikeln.

#### 4.8 Optimierung der Prävasikularisierung mittels Zellinjektion

Mittels Injektion der Endothelzellen an Kulturtag 12 in die Kollagenmatrix, anstelle der gewohnten Zellbesiedlung während der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents, sollten die Endothelzellen in tiefe Bereiche eingebracht werden, um dort Gefäßstrukturen ausbilden zu können. Bei diesem Ansatz könnte eine mögliche Barriere-Funktion der Kollagenmatrix für die Endothelzellen umgangen werden.

Die Injektion der Endothelzellen in die Kollagenmatrix hatte keinen nachteiligen Effekt auf die Gefäßausbildung. Es bildeten sich ausgeprägte Gefäßstrukturen, wie bei der Besiedlung der Kollagenmatrix mit Endothelzellen aus. Die präzise Injektion der Endothelzellen in tiefe Bereiche der Kollagenmatrix war jedoch nicht möglich. Vereinzelt konnten nach der Injektion Endothelzellen in der Tiefe der Kollagenmatrix nachgewiesen werden. Bei den meisten Ansätzen gelangt dies jedoch nicht und die Endothelzellen waren ebenfalls nur oberflächlich lokalisiert.

Bei der Injektion der Zellen kommt es zu einer mechanischen Manipulation der Kollagenmatrix. Dies führte zu keiner Beeinträchtigung der Differenzierung der bereits auf der Kollagenmatrix vorhandenen Epithelzellen. Jedoch war die Ausprägung der *Tight junctions* bei mittels Injektion manipulierten Mundschleimhaut-Äquivalenten sehr gering. Dies lässt annehmen, dass die Funktionalität der Epithelzellschichten unter der

Injektion litt. Außerdem war nach der Zellinjektion kein Nachweis des Basalmembran-Bestandteils Laminin mehr möglich, was bedeutet, dass die Ausbildung der Basalmembran ebenfalls negativ beeinträchtigt wurde. Somit wirkte sich die Endothelzell-Injektion negativ auf die Ausbildung des mehrschichtigen Epithels und der Basalmembran aus. Zum Zeitpunkt der Endothelzell-Injektion befanden sich die Epithelzellen bereits acht Tage auf der Kollagenmatrix und bildeten einen epithelialen Zusammenschluss aus. Dieser wurde durch die mechanische Manipulation langfristig geschädigt, wodurch sich keine Basalmembran und kein funktionaler Zusammenschluss der Epithelzellen mehr ausbilden konnte. Aufgrund dieser Beeinträchtigung und der geringen Erfolgschance beim Treffen der richtigen Stellen der Kollagenmatrix war diese Methode somit nicht geeignet, um die Prävasikularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents zu optimieren.

#### 4.9 ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent

Das Überleben des funktionalen Epithels des *in vitro*-hergestellten Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo* ist für das erfolgreiche Einheilen des Gewebes nach einer Transplantation, sowie für die Funktionalität des Gewebes von entscheidender Bedeutung. Bisher konnte ein Epithel bei der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents erzeugt werden, welches Epithelzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien und eine gewisse Funktionalität *in vitro* vorweisen konnte. Die Ausbildung einer Basalmembran konnte ohne zusätzliche Stimulation nicht erfolgreich erzielt werden. Bei der Kultivierung des Mundschleimhaut-Äquivalents ist es somit von großer Bedeutung, Bedingungen zu schaffen, die nicht nur die Prävasikularisierung, sondern auch die Epithelausbildung und -differenzierung fördern. Je besser das Epithel *in vitro* entwickelt ist, desto größer sind vermutlich die Chancen für eine erfolgreiche Gewebetransplantation. Bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent wurde während des Herstellungsprozesses *in vitro* eine Anwendung der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT) durchgeführt. Es wurde zum einen die metabolische Aktivität und die Ausbildung der Gefäßstrukturen sowie die Ausbildung des Epithels und der Basalmembran *in vitro* analysiert und zum anderen *in ovo* die Funktionalität und das Überleben des Mundschleimhaut-Äquivalents untersucht.

#### 4.9.1 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die metabolische Aktivität *in vitro*

Die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents mit Stoßwellen hatte einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Die metabolische Aktivität des Mundschleimhaut-Äquivalents stieg nach der Behandlung mit Stoßwellen an Kulturtag 19 oder an Kulturtag 26 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht an. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Stoßwellen am 15. Kulturtag zu einer leicht verringerten metabolischen Aktivität des Mundschleimhaut-Äquivalents im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen des Mundschleimhaut-Äquivalents in einem früheren Stadium des Herstellungsprozesses anfälliger für Schäden durch die ESWT-Anwendung sein könnten als zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der Herstellung. Um die Auswirkung der ESWT-Anwendung im speziellen auf die Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent zu beurteilen, wurde die metabolische Aktivität von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und HDMEC mit der metabolischen Aktivität von Tri-Kulturen (Mundschleimhaut-Äquivalente) mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen, nach der ESWT-Anwendung, verglichen. Die metabolische Aktivität der Tri-Kultur war nach der Behandlung mit Stoßwellen am 15. Kulturtag im Vergleich zu der Bi-Kultur geringer. Die ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 führte zu einer höheren metabolischen Aktivität der Tri-Kulturen im Vergleich zu den Bi-Kulturen. Die Behandlung mit Stoßwellen schien somit eine negative Auswirkung auf die metabolische Aktivität insbesondere der Epithelzellen in dem früheren Stadium der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents zu haben. In frühen Entwicklungsphasen von nativen Mundschleimhaut-Geweben ist die Zellzahl und das Differenzierungsstadium der Epithelschicht geringer als in späteren Entwicklungsphasen (Squier and Kremer 2001; Marks and Miller 2019). Dies ist ebenfalls bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent der Fall, was dazu führen könnte, dass die Epithelzellen bzw. das sich bis dahin ausgebildete Epithel eine erhöhte Anfälligkeit für mechanische Belastung aufweist. In fortgeschritteneren Stadien der *in vitro*-Herstellung war die Zelldichte innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents aufgrund von Zellproliferation höher, was zu einer breiteren Epithelschicht führte. Dies könnte die Zellen vor mechanischer Belastung geschützt haben. Darüber hinaus könnte die Behandlung mit Stoßwellen zu diesem Zeitpunkt in der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents dazu geführt haben, dass die verschiedenen Zelltypen

Wachstumsfaktoren freigesetzt haben, was sich positiv auf die metabolische Aktivität und damit auf die Proliferation der Epithelzellen auswirken kann. Dabei könnte es sich zum Beispiel um die Anregung der Freisetzung von VEGF gehandelt haben, welches wiederum den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg hochregulieren kann und damit die Zellaktivität sowie Zellproliferation anregt (Wang et al. 2004; Zhang et al. 2017; Li et al. 2021). Weitere Studien haben ebenfalls eine erhöhte metabolische Aktivität von *in vitro*-Zellkulturen nach einer ESWT-Anwendung gezeigt. Dabei waren die Zellen als Mono-Kulturen in Zellkulturgefäßen oder in Suspension kultiviert (Vetrano et al. 2011; Leone et al. 2016; Kim et al. 2019; Lu et al. 2020). Andere Studien haben negative Auswirkungen von extrakorporalen Stoßwellen auf die Viabilität von Zellen nachgewiesen. Mattyasovszky et al. beobachteten eine geringere Zellviabilität humaner Skelettmuskelzellen nach der Anwendung von ESWT mit einer Energieflussdichte von  $>0,14 \text{ mJ/mm}^2$  (Mattyasovszky et al. 2018). Die Anwendung von ESWT mit noch höherer Intensität erwies sich sogar als zytoreduktiv (Martini et al. 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Energieflussdichte von  $0,12 \text{ mJ/mm}^2$  verwendet. Außerdem wurde in dieser Arbeit, im Gegensatz zu der erwähnten Literatur, die Viabilität der Zellen in einer komplexen gewebeartigen 3D-Umgebung untersucht, wodurch verschiedene Zeitpunkte unterschiedliche Auswirkungen der ESWT-Anwendung zeigten. Die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents aus Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC mit Stoßwellen an Kulturtag 19 hatte keinen fördernden aber auch keinen hemmenden Einfluss auf die metabolische Aktivität des Mundschleimhaut-Äquivalents.

#### 4.9.2 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die Gefäßausbildung

##### *in vitro*

Der optimale Zeitpunkt für eine Stoßwellen-Behandlung von Bi-Kulturen aus HDMEC und Fibroblasten auf der Kollagenmatrix war sieben Tage nach der HDMEC-Aussaat (Tag 19 der Gesamtkultur). Nach der ESWT-Anwendung an diesem Tag hatten die Stoßwellen keinen Einfluss auf die Gefäßbildung, während diese an anderen Tagen der Kultivierung negativ beeinflusst wurde. Die Bildung der gefäßähnlichen Strukturen von HDMEC in Bi-Kulturen zusammen mit Fibroblasten wurde durch die Behandlung mit Stoßwellen am 15. Kulturtag sowie am 26. Kulturtag stark gestört. Diese Ergebnisse zeigten, dass der Zeitpunkt der ESWT-Anwendung innerhalb des Herstellungsprozesses der Gewebe-Äquivalente sehr ausschlaggebend dafür war, ob

die ESWT-Anwendung einen fördernden oder störenden Einfluss auf das Mundschleimhaut-Äquivalent hatte. An Kulturtag 15 befanden sich die HDMEC seit drei Tagen auf der Kollagenmatrix. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Behandlung mit Stoßwellen einen negativen Einfluss auf die Endothelzellen und deren Gefäßausbildung. Die Kulturdauer von drei Tagen reicht nicht aus, um gefäßähnliche Strukturen zu bilden (Heller et al. 2020). Vermutlich wurden die Endothelzellen durch die Behandlung mit Stoßwellen mechanischem Stress ausgesetzt und verloren dadurch die Fähigkeit, Gefäßstrukturen zu bilden. Die Behandlung mit Stoßwellen an Kulturtag 26 fand 14 Tagen nach der HDMEC-Besiedlung statt. Zu diesem Zeitpunkt hatten die HDMEC bereits ein Netzwerk aus gefäßähnlichen Strukturen gebildet (Heller et al. 2020). Das bereits gut ausgeprägte Gefäßnetzwerk schien ebenfalls durch die ESWT-Anwendung gestört zu werden, was vermutlich auch auf die mechanische Belastung zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit Stoßwellen am 19. Kulturtag, als die HDMEC sieben Tage auf der Kollagenmatrix kultiviert worden waren, keine negativen Auswirkungen auf die Gefäßbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zu diesem Kultivierungszeitpunkt hatten sich vermutlich erste anfängliche Gefäßstrukturen ausgebildet. Heller et al. haben gezeigt, dass die VEGF-Sekretion durch Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 19 am höchsten war und danach abnahm. Eine erhöhte VEGF-Konzentration fördert die Zellviabilität, die Zellproliferation, die Zellmigration sowie die Gefäßbildung von HDMEC (Heller et al. 2020). Diese Effekte könnten günstige Bedingungen für die ESWT-Anwendung der HDMEC an Kulturtag 19 im Vergleich zur Behandlung an Kulturtag 15 oder Kulturtag 26 geschaffen haben und die Zellen vor den nachteiligen Auswirkungen der mechanischen Belastung durch die ESWT-Anwendung geschützt haben.

Nach der ESWT-Anwendung der Mundschleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC wurde ein Effekt beobachtet, der auf eine negative Interaktion zwischen den Endothelzellen und den Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent schließen lässt. Die Gefäßstrukturen in der Tri-Kultur mit Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen waren nach der ESWT-Anwendung deutlich weniger ausgeprägt als in der Bi-Kultur mit Fibroblasten und HDMEC nach der Behandlung mit Stoßwellen. Die ESWT-Anwendung bei der Tri-Kultur führte, ähnlich wie bei der Bi-Kultur, zu zerstörten Gefäßstrukturen nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15 oder Kulturtag 26, nur dass diese sich schwerer auswirkte. Nach der ESWT-

Anwendung an Kulturtag 19 waren in der Tri-Kultur zumindest noch Gefäßfragmente vorhanden. Die Anwesenheit von Epithelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent in der Kombination mit der ESWT-Anwendung schien einen negativen Einfluss auf die Gefäßbildung der HDMEC zu besitzen. Wie bereits im Rahmen der parakrinen, interzellulären Analyse beschrieben wurde, wurden in der Tri-Kultur geringere Mengen an Zytokinen sezerniert als in der Bi-Kultur ohne Epithelzellen. Bereits anhand dieser Beobachtung wurde eine hemmende Interaktion zwischen den Epithelzellen und den Endothelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent ersichtlich. Diese Interaktion wirkte sich jedoch nicht auf die Prävasikularisierung aus. Nun schien dieser hemmende Effekt, welcher vermutlich durch die Epithelzellen vermittelt wurde und dessen Mechanismen noch unbekannt sind, in Kombination mit der ESWT-Anwendung zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Prävasikularisierung zu führen. Dies könnte sich damit erklären lassen, dass die Epithelzellen in unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten bereits einen leicht hemmenden Einfluss auf die Endothelzellen ausüben. Die Stoßwellen können die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen anregen (Zhang et al. 2017; Di Stefano et al. 2020). Dadurch wird ihr hemmender Einfluss auf die Endothelzellen nach der ESWT-Anwendung verstärkt, was die Ausbildung von Gefäßstrukturen schwerwiegend beeinflusst. Zusätzlich könnten die Stoßwellen Zellschädigungen bei den Endothelzellen verursacht haben, wie sie in einer anderen Studie beschrieben wurden (Sondén et al. 2002), die sich ohne den Einfluss der Epithelzellen noch nicht äußern, jedoch durch die Kokultivierung mit den Epithelzellen nach der ESWT-Anwendung in Form einer unzulänglichen Gefäßausbildung sichtbar werden.

Die ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent mit Fibroblasten, Epithelzellen und ECFC an Kulturtag 19 hatte ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Gefäßbildung und zeigte somit den gleichen Effekt wie bei der Verwendung der HDMEC. Es ist möglich, dass die Einstellungen der ESWT-Anwendung für die *in vitro*-Experimente angepasst werden müssen, um Zellschäden zu vermeiden und die Prävasikularisierung zu unterstützen. Sung et al. beschrieben eine positive Wirkung einer ESWT-Anwendung auf die Angiogenese durch Anwendung von  $0,14 \text{ mJ/mm}^2$  und 140 Impulsen auf makrovaskuläre Endothelzellen, die in einer 2D-Kultur auf Matrigel® ausgesät wurden (Sung et al. 2022). In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Mundschleimhaut-Äquivalent, welches ein komplexeres 3D-Konstrukt darstellt, mit einer Energieflussdichte von  $0,12 \text{ mJ/mm}^2$ , einem Luftdruck von 3,0 bar, einer

Frequenz von 5 Hz und 500 Impulsen beschossen. Eine Verringerung der Impulsanzahl wäre denkbar. Die ESWT-Anwendung hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der Endothelzellen im Mundschleimhaut-Äquivalent. Sie waren nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26 ebenfalls im oberflächlichen Bereich des Mundschleimhaut-Äquivalents lokalisiert. Es zeigte sich jedoch ein negativer Einfluss auf die Ausprägung von vWF bei den HDMEC nach der Behandlung mit Stoßwellen; vor allem durch die ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 und Kulturtag 26. Die vWF-Ausbildung von Endothelzellen ist ein wichtiger Faktor bei der primären Homöostase (Gogia and Neelamegham 2015). Dadurch lässt sich vermuten, dass die Endothelzellen durch die ESWT-Anwendung in ihrer Funktionalität in gewisser Maße leiden. Die Funktionalität der Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent und der Aufbau der extrazellulären Matrix wurde durch die Behandlung mit Stoßwellen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung nicht negativ beeinflusst. Da die Ausbildung von Gefäßstrukturen von bedeutender Wichtigkeit für das Einwachsen und die Funktionalität eines Gewebe-Äquivalents nach einer Transplantation ist, müssen weitere Versuche folgen, um bessere ESWT-Anwendungsbedingungen für die Gefäßbildung im Mundschleimhaut-Äquivalent zu bestimmen.

#### 4.9.3 Auswirkung der ESWT-Anwendung auf die Ausbildung des Epithels *in vitro*

Die Anwendung der ESWT hatte einen deutlichen Vorteil für die Ausbildung des Epithels und der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vitro*. Die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents mit Stoßwellen am 19. oder 26. Kulturtag führte zu einer deutlich erhöhten Expression der Epithelmarker Zytokeratin 19 und Zytokeratin 13, sowie zu einer erhöhten Expression von Involucrin während der *in vitro*-Kultur im Vergleich zu einem unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalent. Die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents am 15. Kulturtag führte zu keiner Verbesserung der Expression von Involucrin, Zytokeratin 13 oder Zytokeratin 19. Zytokeratin 19 wird von basalen, undifferenzierten und sich teilenden Epithelzellen exprimiert (Moll et al. 1982; Squier and Kremer 2001). Zytokeratin 13 wird von suprabasal differenzierten Epithelzellen exprimiert und Involucrin von vollständig differenzierten Epithelzellen (Banks-Schlegel and Green 1981; Barrett et al. 1998). Die Tatsache, dass alle drei Marker nach der Behandlung mit Stoßwellen deutlich erhöht exprimiert waren, deutete auf die Induktion eines besser differenzierten,

mehrschichtigen Epithels hin. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die *in vitro*-Anwendung der ESWT eine positive Auswirkung auf die Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung verschiedener Zelltypen hat (Tamma et al. 2009; Leone et al. 2016; Cui et al. 2021). Zudem wurden in einer Studie zur *in vivo*-Anwendung der ESWT nach der Behandlung eine Verdickung der Hautschichten bei Ratten beobachtet (Lima Morais et al. 2019). Eine weitere Studie berichtete, dass die ESWT-Anwendung die Epithelisierung auf den Spenderseiten humaner Spalttransplantate deutlich beschleunigte (Ottomann et al. 2010). Die Behandlung mit Stoßwellen könnte somit die Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen des Mundschleimhaut-Äquivalents in der *in vitro*-Kultur stimulieren. Eine ESWT-Anwendung kann mehrere Signalwege in Zellkulturen induzieren, darunter ERK- (Weihs et al. 2014), Wnt- (Zhang et al. 2017) und FAK-Signalwege (Xu et al. 2012). Diese Signalwege sind bei Wundheilungsprozessen wichtig (Bielefeld et al. 2013; Ren et al. 2019) und könnten für die verstärkte Bildung des mehrschichtigen Epithels des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vitro* verantwortlich sein. Darüber hinaus induzieren die Stoßwellen die Hemmung der Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ , die durch die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eine wichtige Rolle bei der epithelialen Wundheilung spielt (Wang et al. 2004; Chen et al. 2020). Der fördernde Einfluss der ESWT-Anwendung auf die Ausbildung des Epithels ist nicht vorhanden, wenn die Behandlung an Kulturtag 15 stattfindet und scheint somit zu einem zu früheren Zeitpunkt während der Mundschleimhaut-Äquivalent-Herstellung nicht zum Tragen zu kommen. Auch die *in vitro*-Expression von Occludin, dem Bestandteil der *Tight junctions*, war nach der ESWT-Anwendung des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle stärker ausgeprägt. Die Behandlung an Kulturtag 15 führte zu keiner stärkeren Ausprägung der *Tight junctions*. Das Vorkommen von *Tight junctions* als Zell-Zell-Interaktion, dient der Funktionalität der Epithelschicht von Mundschleimhaut (Garant 2003; Feldman et al. 2005). Die erhöhte Expression der Proteinkomponente der *Tight junctions* im Mundschleimhaut-Äquivalent deutete auf eine funktionellere Epithelzellschicht nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 hin.

Kollagen IV und Laminin sind wichtige Bestandteile der Basalmembran (Yurchenco and Patton 2009). Die Ausprägung des Basalmembran-Bestandteils Laminin innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents war nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15 leicht verstärkt im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die ESWT-Anwendung



an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 führte zu einer stärkeren Ausprägung von Laminin. Der Basalmembran-Bestandteil Kollagen IV konnte im unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalent gar nicht nachgewiesen werden. Die ESWT-Anwendung an Kulturtag 15 führte ebenfalls zu keiner Ausprägung von Kollagen IV. Jedoch führte die ESWT-Anwendung des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 zu einer nachweisbaren Ausprägung von Kollagen IV. Die Basalmembran in gesundem Mundschleimhautgewebe ist durch eine ausgeprägte Expression von Kollagen IV und Laminin gekennzeichnet (Kannan et al. 1994), was bei dem unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalent nicht der Fall war. Somit könnte das Problem der unzureichenden Ausbildung einer Basalmembran im *in vitro*-erzeugten Mundschleimhaut-Äquivalent möglicherweise mit der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 überwunden werden. Die geförderte Differenzierung der Epithelzellen durch die Stoßwellen könnte die Ausbildung der Basalmembran angeregt haben. In einer Studie zur Ausbildung einer Basalmembran in der embryonalen Niere zeigte sich, dass das undifferenzierte Mesenchym keine Basalmembran ausbildete und das differenzierte Epithel zu einer Ausbildung der Basalmembran führte (Ekblom 1981). Die Ausbildung der Basalmembran könnte außerdem durch Zytokine begünstigt worden sein, deren Sekretion neben anderen Signalwegen zum Beispiel durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg gefördert wurde, der wiederum durch eine ESWT-Anwendung aktiviert wurde (Nagendran et al. 2015). Welche Zytokine sowie Mechanismen daran beteiligt waren, muss in folgenden Versuchen untersucht werden.

Somit zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Anwendung der ESWT bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent während der *in vitro*-Kultivierung von großer Bedeutung für die Zellviabilität, die Prävascularisierung und die Ausbildung des Epithels sowie der Basalmembran war. Die *in vitro*-Ausbildung des funktionalen Epithels und der Basalmembran konnten durch die ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder Kulturtag 26 deutlich gefördert werden. Auch die metabolische Aktivität des Mundschleimhaut-Äquivalents wurde durch die ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 oder 26 unterstützt. Die Gefäßstrukturen waren nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 besser ausgeprägt als nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 15 oder Kulturtag 26. Da eine erfolgreiche, tiefgehende Prävascularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents weiterhin angestrebt wird, um einen schnelleren und besseren Anschluss des transplantierten Gewebes an das Gefäßsystem des Empfängers zu erreichen (Heller et al. 2016; Smirani et al. 2020), wurde das Mundschleimhaut-Äquivalent zur

Untersuchung der *in vivo*-Anwendung am 19. Kulturtag mit Stoßwellen behandelt. Um die Prävasikularisierung und die Ausbildung des Epithels sowie der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents im Hinblick auf die *in vivo*-Anwendung zu untersuchen, wurden *in ovo*-Versuche auf der CAM durchgeführt.

#### 4.10 Das Überleben des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo*

Die Beurteilung des Überlebens des Mundschleimhaut-Äquivalents *in vivo* wurde mittels des Chorioallantoismembran (CAM)-Assays *in ovo* durchgeführt. Dabei wurden Mundschleimhaut-Äquivalente nach verschiedenen *in vitro*-Kultivierungszeiten auf die CAM überführt, nach fünf bis zehn Tagen wieder abgenommen und immunhistochemisch auf die Gefäß- sowie Epithel- und Basalmembran-Ausbildung analysiert.

##### 4.10.1 Mundschleimhaut-Äquivalente nach verschiedenen *in vitro*-Kultivierungszeiten auf der CAM

Zum einen wurden Mundschleimhaut-Äquivalente an Kulturtag 12 auf die CAM überführt, da sich zu diesem Kultivierungszeitpunkt das Epithel *in vitro* bereits angefangen hatte auszubilden und zu differenzieren. Hierbei wurden die Mundschleimhaut-Äquivalente entweder an Kulturtag 12, vor der Zugabe der Endothelzellen, auf die CAM überführt oder an Kulturtag 12, 4 Stunden nach der Zugabe der Endothelzellen, bevor eine Gefäßausbildung stattgefunden hat. Hierbei wurden HDMEC oder ECFC als Endothelzell-Quelle verwendet und miteinander verglichen. Zum anderen wurden Mundschleimhaut-Äquivalente bis Kulturtag 33 *in vitro* kultiviert und dann auf die CAM überführt. Hierbei wurden Bi-Kulturen aus Fibroblasten und Epithelzellen auf der Kollagenmatrix kultiviert oder Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen. Auch hierbei wurden HDMEC oder ECFC verwendet und miteinander verglichen. Das Überführen von Kollagenmatrices mit Bi-Kulturen ohne Endothelzellen zusätzlich zu den Tri-Kulturen mit Endothelzellen auf die CAM hatte den Hintergrund, dass so das Fehlen und das Vorhandensein von Endothelzellen und deren Auswirkung einer Prävasikularisierung der Mundschleimhaut-Äquivalente *in ovo* beurteilt und verglichen werden konnte.

Die *in vitro*-Analyse des Mundschleimhaut-Äquivalents nach 12 Kulturtagen ergab, dass sich zu diesem Zeitpunkt bereits eine dünne Epithelschicht ausgebildet hatte.

Diese wies nur eine geringe Funktionalität auf und es hatte sich keine Basalmembran ausgebildet. Wurde dieses Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 12 vor der Zugabe der Endothelzellen, also als Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen auf die CAM überführt, ließ sich nach der Entnahme von der CAM eine Tenascin-Färbung nachweisen, die nicht das komplette Mundschleimhaut-Äquivalent durchzog. Tenascin wird von Fibroblasten sezerniert und ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (Taylor et al. 1989). Die Fibroblasten bildeten somit im Mundschleimhaut-Äquivalent ohne Endothelzellen eine extrazelluläre Matrix aus, die nach der *in ovo*-Kultivierung noch nachweisbar war. Das Mundschleimhaut-Äquivalent besaß nach der Entnahme von der CAM kein gut ausgebildetes und differenziertes Epithel, nachgewiesen anhand der Involucrin-, Zytokeratin 13 und Zytokeratin 19-Analyse. Mittels Laminin- und Kollagen IV-Färbung konnte die Ausbildung einer Basalmembran beurteilt werden (Neal et al. 2009; Yurchenco and Patton 2009). Es hatte sich *in ovo* keine Basalmembran ausgebildet und das Epithel wies nur eine geringe Funktionalität (Nachweis über Occludin) auf. Bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent mit einer Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC, die an Kulturtag 12 4 Stunden nach der Endothelzell-Zugabe auf die CAM überführt wurden, waren die HDMEC im Mundschleimhaut-Äquivalent nach der Abnahme von der CAM CD31-positiv. Funktionale Endothelzellen prägen CD31 auf ihrer Zelloberfläche aus (Lertkiatmongkol et al. 2016). Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die HDMEC *in ovo* überlebt haben. Jedoch war vWF nicht nachweisbar, was daraufhin deutete, dass die Zellen noch nicht ihre volle Funktion ausgeprägt hatten. Anhand der Tenascin-Färbung ließ sich darauf schließen, dass die Fibroblasten während der *in vitro*-Kultivierung eine extrazelluläre Matrix ausgebildet hatten, die in dem Mundschleimhaut-Äquivalent nach der Entnahme von der CAM noch nachweisbar war, aber ebenfalls nicht das gesamte Mundschleimhaut-Äquivalent durchzogen hatte. Anhand der Analyse der epithelialen Marker und Occludin, dem Bestandteil von *Tight junctions*, zeigte sich, dass das Epithel nicht gut ausgeprägt und differenziert war, sowie eine geringe Funktionalität aufwies. Es war jedoch bei der Tri-Kultur besser ausgebildet als bei der Bi-Kultur ohne Endothelzellen. Eine Basalmembran hatte sich ebenfalls nicht ausgebildet. Das Mundschleimhaut-Äquivalent mit ECFC anstelle von HDMEC zeigte ein ähnliches Ergebnis. Somit ist die *in vitro*-Kultivierungsdauer des Mundschleimhaut-Äquivalents von 12 Kulturtagen nicht ausreichend, um ein funktionales Epithel für die *in ovo*-Anwendung auszubilden. Die Anwesenheit von Endothelzellen im Mundschleimhaut-

Äquivalent, egal ob es sich dabei um HDMEC oder ECFC handelt, unterstützte jedoch die frühe Epithelausbildung *in ovo*, obwohl sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Prävasikularisierung ausgebildet hatte.

Das Mundschleimhaut-Äquivalent, welches 33 Tage *in vitro* kultiviert worden war, hatte ein gut ausgeprägtes, mehrschichtiges Epithel, bei dem sich jedoch ebenfalls noch keine Basalmembran ausgebildet hatte. Das Mundschleimhaut-Äquivalent, welches 33 Tage kultiviert wurde und mit Endothelzellen besiedelt wurde, besaß eine gut ausgeprägte oberflächliche Prävasikularisierung. Wurde das Mundschleimhaut-Äquivalent nach den 33 Kulturtagen auf die CAM überführt, trug es nach der Entnahme von der CAM CD31- sowie vWF-positive HDMEC. Dies bedeutete, dass die HDMEC während der mehrtägigen *in ovo*-Kultur vital blieben und eine bessere Funktionalität aufwiesen als in dem 12 Tage kultivierten Mundschleimhaut-Äquivalent auf der CAM. Die Tenascin-Färbung war in dem Mundschleimhaut-Äquivalent, welches an Kulturtag 33 auf die CAM überführt wurde in der gesamten Kollagenmatrix verteilt. Dies ließ darauf schließen, dass die Kultivierungsdauer des Mundschleimhaut-Äquivalents von 33 Tagen für die *in ovo*-Anwendung besser für die Ausbildung und Verteilung der extrazellulären Matrix ist als die Kultivierungsdauer von 12 Tagen. Das Mundschleimhaut-Äquivalent, welches nach den 33 Kulturtagen auf die CAM überführt wurde, zeigte nach der Entnahme von der CAM ein besser ausgeprägtes und differenziertes Epithel mit einer höheren Funktionalität und Nachweisen von Basalmembran-Bestandteilen im Vergleich zu dem Mundschleimhaut-Äquivalent, welches nach 12 Tagen auf die CAM überführt wurde. Das Mundschleimhaut-Äquivalent mit ECFC anstelle von HDMEC zeigte ein ähnliches Ergebnis. Die Abwesenheit von Endothelzellen führte zu einer schlechteren Ausprägung des Epithels und zu keiner Ausprägung der Basalmembran *in ovo*. Das deutete darauf hin, dass die Prävasikularisierung eine schnellere Anbindung des Transplantats an das Gefäßsystem des Huhns ermöglichte und damit die Epithel- und Basalmembran-Ausbildung unterstützte. Es zeigte sich, dass nur etwa die Hälfte der überführten Mundschleimhaut-Äquivalente *in ovo* an der CAM anwuchsen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die oberflächliche Prävasikularisierung trotz des bereits gezeigten Vorteils für die Unterstützung des Epithels noch nicht ausreichend war, um eine zuverlässige Anbindung an das Empfänger-Gefäßsystem zu gewährleisten. Somit muss weiterhin eine tiefgehenden Prävasikularisierung angestrebt werden.

Zusammenfassend zeigte sich somit, dass die *in vitro*-Kultivierungsdauer des Mundschleimhaut-Äquivalents von 33 Tagen zielführender für zukünftige *in vivo*-Anwendungen ist als die Kultivierungsdauer von 12 Tagen. Obwohl sich bereits nach 12 Tagen der *in vitro*-Kultivierung des Mundschleimhaut-Äquivalents eine Epithelschicht ausgebildet hatte, war diese in ihrer Differenzierung und Funktionalität für die *in ovo*- bzw. *in vivo*-Anwendung noch nicht ausreichend ausgeprägt. Es konnte bestätigt werden, dass die Prävascularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents einen Vorteil in Bezug auf die Ausbildung der Basalmembran und die des differenzierten, mehrschichtigen Epithels während der *in ovo*-Kultur bietet. Außerdem führte die Verwendung von ECFC im *in ovo*-Modell zu ähnlichen Ergebnissen wie die Verwendung von HDMEC. Weitere Versuche mit ECFC müssen folgen, um die Anwendung der Endothelzellen aus Vollblutspenden vollständig zu etablieren und HDMEC für die Herstellung personalisierter Mundschleimhaut-Äquivalente zu ersetzen.

#### 4.10.2 Mundschleimhaut-Äquivalente nach ESWT-Anwendung auf der CAM

Durch die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents mit Stoßwellen an Kulturtag 19 oder 26 wurde eine deutliche Verbesserung der Ausbildung des Epithels und der Basalmembran *in vitro* erreicht. Eine Verbesserung der *in vitro*-Gefäßausbildung in den Mundschleimhaut-Äquivalenten konnte durch die ESWT-Anwendung nicht erzielt werden. Da die Prävascularisierung für die Mundschleimhaut-Äquivalente wichtig ist und die Gefäßausbildung nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 ausgeprägter war als nach der Anwendung an Kulturtag 15 oder 26, wurde anschließend überprüft, ob sich die ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 positiv auf das Mundschleimhaut-Äquivalent in der *in ovo*-Anwendung auswirkt. Hierfür wurden unbehandelte sowie mit Stoßwellen behandelte Mundschleimhaut-Äquivalente an Kulturtag 33 auf die CAM überführt. Auch hierbei wurden Gewebe-Äquivalente mit Endothelzellen (HDMEC oder ECFC), oder ohne Endothelzellen hergestellt und auf die CAM überführt.

Das Mundschleimhaut-Äquivalent, welches mit Stoßwellen behandelt wurde, zeigte in der *in vitro*-Analyse ein deutlich besser ausgeprägtes mehrschichtiges Epithel und die Ausbildung einer Basalmembran im Vergleich zu unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten. Nach der Entnahme von mit Stoßwellen behandelten Bi-Kulturen mit

Fibroblasten und Epithelzellen von der CAM zeigte sich, dass sich die *in vitro*-ESWT-Anwendung ebenfalls positiv auf die Differenzierung der Epithelschicht (Involucrin-, Zytokeratin 13- sowie Zytokeratin 19-Ausprägung) in der *in ovo*-Anwendung auswirkte. Die mit Stoßwellen behandelten Kollagenmatrices zeigten dabei eine deutlich stärkere Ausprägung der drei epithelialen Marker als die unbehandelte Kontrolle. Somit verbesserte die ESWT-Anwendung während der *in vitro*-Kultur die Ausbildung und Differenzierung eines mehrschichtigen Epithels und führte zu einem besser differenzierten Epithel während der *in ovo*-Kultur. Auch die Ausbildung von *Tight junctions* (Occludin-Ausprägung) wurde durch die ESWT-Anwendung bei den Bi-Kulturen aus Fibroblasten und Epithelzellen auf der Kollagenmatrix deutlich positiv beeinflusst. Somit könnte die ESWT-Anwendung das Überleben und die Funktionalität der *in vitro*-generierten Mundschleimhaut-Äquivalente nach der Transplantation fördern. Eine höhere Ausprägung des Basalmembran-Bestandteils Laminin und eine etwas höhere Ausprägung des Basalmembran-Bestandteils Kollagen IV nach der Entnahme von der CAM wurde bei den Bi-Kulturen, die mit Stoßwellen behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Gewebe-Äquivalenten beobachtet. Die Ausbildung der Basalmembran nach der Behandlung mit Stoßwellen während der *in vitro*-Kultur förderte somit die Ausbildung und das Überleben der Basalmembran während der *in ovo*-Anwendung nach der Transplantation auf die CAM.

Die Behandlung des Mundschleimhaut-Äquivalents aus einer Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und HDMEC mit Stoßwellen führte zu einer beeinträchtigten Ausprägung von CD31 und einem Verlust der vWF-Ausprägung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Das zeigte sich auch bei den mit Stoßwellen behandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten nach der Entnahme von der CAM. Somit zeigten sich die Schäden der *in vitro*-ESWT-Anwendung auf die Gefäßausbildung im Mundschleimhaut-Äquivalent auch noch weiterhin nach der *in ovo*-Anwendung. Die Behandlung mit Stoßwellen hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung und Verteilung der extrazellulären Matrix des Mundschleimhaut-Äquivalents in der *in ovo*-Anwendung, unabhängig davon, ob HDMEC, ECFC oder keine Endothelzellen vorhanden waren. Somit lässt sich zuverlässig eine extrazelluläre Matrix im Mundschleimhaut-Äquivalent ausbilden. Wie bereits beschrieben, waren die gefäßähnlichen Strukturen in Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen nach der ESWT-Anwendung schlechter ausgeprägt als in Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Endothelzellen nach der ESWT-Anwendung. Die Kokultivierung mit Epithelzellen in

den Gewebe-Äquivalenten schien einen negativen Einfluss auf die *in vitro*-Gefäßbildung der Endothelzellen nach der ESWT-Anwendung zu haben. Gleichzeitig wurde die gerade beschriebene stimulierende Wirkung der ESWT-Anwendung auf die Epithel- und Basalmembranbildung in der Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen durch die Tri-Kultivierung mit Endothelzellen in den Mundschleimhaut-Äquivalenten während der *in ovo*-Kultur gestört. Die Behandlung mit Stoßwellen von Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC oder ECFC führte zu einem Verlust der Ausprägung des Basalmembran-Bestandteils Laminin. Außerdem führte die Behandlung mit Stoßwellen von Mundschleimhaut-Äquivalenten mit HDMEC zu einem Verlust der Ausprägung des Basalmembran-Bestandteils Kollagen IV. Die Differenzierung der Epithelzellen war dabei weniger ausgeprägt als bei den Tri-Kulturen ohne ESWT-Anwendung. Demnach wurde der fördernde Effekt der Stoßwellen auf das Epithel und die Basalmembran durch die Endothelzellen *in ovo* stark beeinträchtigt. Die ESWT-Anwendung bei den Tri-Kulturen mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen bewirkte somit eine gegenseitige Hemmung der Epithelzellen und der Endothelzellen *in ovo*. Die Mechanismen, die dem zugrunde liegen sind noch unklar und müssen in folgenden Versuchen aufgedeckt werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine frühere Studie, dass ischämische Hautlappen, die mit endothelialen Vorläuferzellen besiedelt und mit Stoßwellen behandelt wurden, bei *in vivo*-Experimenten an Ratten das Überleben des Hautlappens förderten (Zhang et al. 2014). In dieser Studie war die Haut der Ratten zwar durch eine Ischämie beeinträchtigt, jedoch in der physiologischen Umgebung vollständig differenziert und ausgebildet. In diesem Rahmen ging nach der ESWT-Anwendung keine gegenseitige Hemmung der Epithelzellen und der Endothelzellen aus. Es zeigt, dass sogar ein fördernder Einfluss der Stoßwellen ausgehen kann, welcher die Epithelausbildung und gleichzeitig die Gefäßausbildung unterstützt.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine ESWT-Anwendung bei dem Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 19 einen bedeutenden Vorteil für die Ausbildung des mehrschichtigen Epithels und die Ausbildung der Basalmembran des Mundschleimhaut-Äquivalents bieten kann und somit dessen Überleben und Funktionalität *in vivo* deutlich fördern könnte. Außerdem fördert die Prävasikularisierung durch HDMEC oder ECFC ohne eine Stoßwellen-Behandlung die Ausbildung des Epithels sowie der Basalmembran *in ovo*. Jedoch führte die Kombination der Prävasikularisierung und der ESWT-Anwendung zu negativen

Interaktionen und einer gegenseitigen Hemmung zwischen den Epithelzellen und Endothelzellen innerhalb des Mundschleimhaut-Äquivalents. Für die Herstellung eines funktionalen Mundschleimhaut-Äquivalents zur personalisierten Geweberekonstruktion ist es von entscheidender Bedeutung eine optimale Ausbildung des Epithels sowie der Basalmembran mit der Ausbildung einer funktionalen und tiefgehenden Prävasikularisierung zu vereinen.

#### 4.11 Ausblick

Es konnte ein Mundschleimhaut-Äquivalent mit einer Tri-Kultur aus primären Zellen hergestellt werden, welches eine Epithelschicht sowie eine oberflächliche Prävasikularisierung besaß. Mit einer ESWT-Anwendung während der *in vitro*-Kultivierung von Bi-Kulturen mit Fibroblasten und Epithelzellen wurde eine Methode etabliert, mit der die Ausbildung und Differenzierung des Epithels sowie die Ausbildung der Basalmembran *in vitro* deutlich stimuliert werden konnte. Dies führte zu einem ausgeprägteren und besser differenzierten Epithel während einer *in ovo*-Kultivierung, was darauf hindeutet, dass das Überleben und die Funktionalität des Mundschleimhaut-Äquivalents nach einer Transplantation *in vivo* durch die ESWT-Anwendung unterstützt werden könnte. Innerhalb einer Tri-Kultivierung mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen fand nach der ESWT-Behandlung jedoch eine beeinträchtigende Interaktion zwischen den Epithelzellen und den Endothelzellen statt. Diese Interaktion wirkte sich negativ auf die Gefäß- sowie Epithelausbildung des Mundschleimhaut-Äquivalents *in ovo* aus. Es müssen Analysen folgen, die die zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktionen zwischen Epithel- und Endothelzellen nach der Behandlung mit Stoßwellen aufdecken. Hierfür kann die Zytokin-Sekretion des Mundschleimhaut-Äquivalents als Tri-Kultur mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen sowie der Bi-Kultur mit Fibroblasten und Epithelzellen nach der ESWT-Anwendung mittels ELISA untersucht werden. Dabei sollte betrachtet werden, welche Zytokine nach der ESWT-Anwendung deutlich niedriger oder stärker sezerniert werden im Vergleich zu unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalenten.

Da die Prävasikularisierung und die Epithelausbildung des Mundschleimhaut-Äquivalents gleichermaßen wichtig für das Überleben und die Funktionalität des Gewebe-Äquivalents *in vivo* sind, muss die beeinträchtigende Interaktion der Endothelzellen und der Epithelzellen verhindert werden, um optimale Bedingungen für



die Epithelausbildung und gleichzeitig für die Prävasikularisierung zu schaffen. Weitere Experimente sind erforderlich, bei denen die Einstellungen der ESWT-Anwendung für das *in vitro*-generierte, prävasikularisierte Mundschleimhaut-Äquivalent dahingehend untersucht und eventuell optimiert werden. Dabei können die Energieflussdichte, die Frequenz und die Impulsanzahl der Stoßwellen variiert werden. Damit die Endothelzellen trotz der ESWT-Anwendung des Mundschleimhaut-Äquivalents nicht den Stoßwellen ausgesetzt werden, wäre es möglich die Besiedlungsreihenfolge innerhalb der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents anzupassen und die Endothelzellen erst nach der ESWT-Anwendung an Kulturtag 19 hinzuzugeben. So könnte Die Ausbildung des Epithels und die der Basalmembran weiterhin durch die ESWT-Anwendung gefördert werden und die Endothelzellen nachträglich innerhalb von 14 Tagen bis zum Kulturende an Kulturtag 33 Gefäßstrukturen ausbilden. Mit dieser Variante könnten die Vorteile der ESWT-Anwendung und der Prävasikularisierung kombiniert und die hemmenden Zellinteraktionen vermindert oder umgangen werden. Um des Weiteren die Blutgefäßinfiltration nach einer Transplantation des Mundschleimhaut-Äquivalents anzuregen, könnte eine zusätzliche ESWT-Anwendung *in ovo* durchgeführt werden. Dabei könnte das Mundschleimhaut-Äquivalent am 4. Embryonaltag auf die CAM überführt und drei Tage später mit Stoßwellen behandelt werden.

Weiterhin sollte eine tiefergehende Prävasikularisierung des Mundschleimhaut-Äquivalents angestrebt werden. Die ermittelte Freisetzungskinetik der Nanopartikel, welche mit angiogenen Wachstumsfaktoren beladen werden können, stellt eine vielversprechende Grundlage für ihre Verwendung zur chemotaktischen Modifikation des Mundschleimhaut-Äquivalents zur Anregung der Endothelzellmigration dar. Weitere Versuche müssen folgen, um die Anwendung von Nanopartikeln zur Erzeugung einer tiefgehenden Prävasikularisierung zu realisieren. Hierfür muss die Wechselwirkung des Nanopartikelmaterials (Stärke und HES) und des eingekapselten Wachstumsfaktors verhindert werden. Sollte dies biotechnologisch und chemisch nicht möglich sein können weitere Materialien zur Nanopartikel-Herstellung zur Anwendung im Mundschleimhaut-Äquivalent in Betracht gezogen und analysiert werden, bei denen man sich das bereits untersuchte Prinzip der Freisetzungskinetik zu Nutze machen kann.

Für die Annäherung an die klinische Anwendung des Mundschleimhaut-Äquivalents ist die Verwendung autologer Zellen für die Patientinnen und Patienten unabdingbar. Eine finale Etablierung der Verwendung von ECFC anstelle von HDMEC im Mundschleimhaut-Äquivalent ist somit zwingend notwendig. Auf der Grundlage der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit sind Tierversuche im Maus-Modell erforderlich, um die Ergebnisse aus dem CAM-Modellsystem zu validieren. Dabei sollte außerdem die Funktionalität der Gefäßstrukturen und die Anbindung an das Gefäßsystem des Empfängermodells genauer untersucht werden. Mittels immunhistochemischer sowie Eosin-Färbung nach der Entnahme der Transplantate, können die Lumen der *in vitro*-ausgebildeten Gefäßstrukturen auf die Anwesenheit von Erythrozyten untersucht werden, um die Anbindung an das Gefäßsystem des Empfängermodells aufzuzeigen. Ein Mundschleimhaut-Äquivalent bestehend aus Fibroblasten und Epithelzellen aus einem kleinen Stanzbiopsiat der Mundschleimhaut und ECFC aus einer Blutspende von einer Patientin oder einem Patienten auf einer sich in der klinischen Anwendung befindlichen Kollagenmatrix stellt eine geeignete personalisierte Alternative zu autologer Mundschleimhaut in der rekonstruktiven Chirurgie dar.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Jo C, Nam KC, Ahn DU. 2014. Enzymatic hydrolysis of ovalbumin and the functional properties of the hydrolysates. *Poult Sci.* 93(10):2678–2686.
- Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. 2019. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells.*8(5):471.
- Alberts B. 2002. *Molecular biology of the cell: Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland. ISBN: 9780815332183.
- Almansoori AA, Kim B, Lee J-H, Tran SD. 2020. Tissue Engineering of Oral Mucosa and Salivary Gland: Disease Modeling and Clinical Applications. *Micromachines.* 11(12):1066.
- Amirsadeghi A, Jafari A, Eggermont LJ, Hashemi S-S, Bencherif SA, Khorram M. 2020. Vascularization strategies for skin tissue engineering. *Biomater Sci.* 8(15):4073-4094.
- Asadian M, Chan KV, Norouzi M, Grande S, Cools P, Morent R, Geyter N de. 2020. Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials.* 10(1):119.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275(5302):964–967.
- Asakawa N, Shimizu T, Tsuda Y, Sekiya S, Sasagawa T, Yamato M, Fukai F, Okano T. 2010. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials.* 31(14):3903–3909.
- Auersperg V, Trieb K. 2020. Extracorporeal shock wave therapy: an update. *EFORT Open Rev.* 5(10):584–592.
- Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G. 2014. *Duale Reihe Anatomie. 3., Auflage.* Stuttgart: Thieme. 1352 p. (DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob). ISBN: 9783131360434.
- Bader C. 2021. *Parakrine Kommunikation von primären Fibroblasten und endothelialen Progenitorzellen im Kontext der Prävasikularisierung komplexer Gewebeäquivalente [Inauguraldissertation].* Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit.
- Baker BM, Chen CS. 2012. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci.* 125(Pt 13):3015–3024.
- Banks-Schlegel S, Green H. 1981. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J Cell Biol.* 90(3):732–737.
- Barrett AW, Selvarajah S, Franey S, Wills KA, Berkovitz BK. 1998. Interspecies variations in oral epithelial cytokeratin expression. *J Anat.* 193 (Pt 2):185–193.
- Baschang G. 1962. Aminosucker, Synthesen und Vorkommen in Naturstoffen. In: Zechmeister L, editor. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress*

- in the Chemistry of Organic Natural Products / Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles. Vienna: Springer Vienna. p. 200–270.
- Basso FG, Pansani TN, Marcelo CL, Souza Costa CA de, Hebling J, Feinberg SE. 2018. Phenotypic markers of oral keratinocytes seeded on two distinct 3D oral mucosa models. *Toxicol In Vitro*. 51:34–39.
- Bauer H-KH. 2018. Etablierung und Charakterisierung eines prävascularisierten in vitro Schleimhaut-Äquivalents. [Dissertation]: Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Becker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F. 2009. Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. *Clin Oral Implants Res*. 20(7):742–749.
- Beier L, Faridi A, Neumann C, Paepke S, Mau C, Keller M, Strittmatter HJ, Gerber-Schäfer C, Bauer L, Karsten MM, Kümmel S, Blohmer J-U. 2021. Human Acellular Dermal Matrix (Epiflex®) in Immediate Implant-Based Breast Reconstruction after Skin- and Nipple-Sparing Mastectomy and Treatment of Capsular Fibrosis: Results of a Multicenter, Prospective, Observational NOGGO-AWOGyn Study. *Breast Care*. 16(5):461–467.
- Benning L, Gutzweiler L, Tröndle K, Riba J, Zengerle R, Koltay P, Zimmermann S, Stark GB, Finkenzeller G. 2018. Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 106(4):935–947.
- Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. 2013. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 70(12):2059–2081.
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int*. 19(5):413–430.
- Bourland J, Mayrand D, Tremblay N, Moulin VJ, Fradette J, Auger FA. 2019. Isolation and Culture of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Methods Mol Biol*. 1993:79–90.
- Boyum A. 1964. SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS. *Nature*. 204:793–794.
- Brizuela M, Winters R. 2022. *Histology, Oral Mucosa*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Browne BM, Vanni AJ. 2017. Use of Alternative Techniques and Grafts in Urethroplasty. *Urol Clin North Am*. 44(1):127–140.
- Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. 1985. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(21):7340–7344.
- Buranaamnuay K. 2021. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Vet J*. 11(2):251–269.
- Chen R-F, Lin Y-N, Liu K-F, Wang C-T, Ramachandran S, Wang C-J, Kuo Y-R. 2020. The Acceleration of Diabetic Wound Healing by Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Involves in the GSK-3 $\beta$  Pathway. *Biomedicines*. 9(1):21.
- Chen EP, Toksoy Z, Davis BA, Geibel JP. 2021. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 9:664188.

- Collis RE, Collins PW, Gutteridge CN, Kaul A, Newland AC, Williams DM, Webb AR. 1994. The effect of hydroxyethyl starch and other plasma volume substitutes on endothelial cell activation; an in vitro study. *Intensive Care Med.* 20(1):37–41.
- Critser PJ, Yoder MC. 2010. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 15(1):68–72.
- Cui HS, Joo SY, Cho YS, Park JH, Ro YM, Kim J-B, Seo CH. 2021. Effect of extracorporeal shock wave therapy on keratinocytes derived from human hypertrophic scars. *Sci Rep.* 11(1):17296.
- Dau M, Volprich L, Grambow E, Vollmar B, Frerich B, Al-Nawas B, Kämmerer PW. 2020. Collagen membranes of dermal and pericardial origin-In vivo evolvement of vascularization over time. *J Biomed Mater Res A.* 108(12):2368–2378.
- Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen e.V.. 2022. Rekonstruktive Chirurgie. Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen. [Homepage] inhaltlich verantwortlich: Prof. Dr. med. habil. Henrik Menke (Hofheim am Taunus). <https://www.dgpraec.de/plastische-chirurgie/rekonstruktive-chirurgie/>.
- Dey M, Ozbolat IT. 2020. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep.* 10(1):14023.
- Di Stefano A, Frairia R, Ricciardolo FLM, Gnemmi I, Marino Gammazza A, Piraino A, Cappello F, Balbi B, Catalano MG. 2020. Extracorporeal Shock Waves Increase Markers of Cellular Proliferation in Bronchial Epithelium and in Primary Bronchial Fibroblasts of COPD Patients. *Can Respir J.* 2020:1524716.
- Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, Little CD. 2000. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev Biol.* 224(2):178–188.
- Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH, editors. 2013. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience.*
- Dunlevy JR, Couchman JR. 1995. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci.* 108 (Pt 1):311–321.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 146(5):1029–1039.
- Eckers A, Altschmied J, Haendeler J. 2012. Oxidativer Stress im Endothel und bei Diabetes Typ 2 [Oxidative stress in endothelial cells and in diabetes type 2]. *Z Gerontol Geriatr.* 45(2):90–94.
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun.* 61(11):4569–4574.
- Edmans JG, Clitherow KH, Murdoch C, Hatton PV, Spain SG, Colley HE. 2020. Mucoadhesive Electrospun Fibre-Based Technologies for Oral Medicine. *Pharmaceutics.* 12(6):504.
- Eklom P. 1981. Formation of basement membranes in the embryonic kidney: an immunohistological study. *J Cell Biol.* 91(1):1–10.
- Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(6):883–917.

- Fernandez PB, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsässer HP, Müller R, Havemann K. 2000. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*. 65(5):287–300.
- Ferrara N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 77(7):527–543.
- Ferrara N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 25(4):581–611.
- Fodor WL. 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*. 1:102.
- Garant PR. 2003. Oral cells and tissues. Chicago: Quintessence Pub. Co. 1. Auflage. 430 s. ISBN: 978-0-86715-429-0.
- German Z, Chambliss KL, Pace MC, Arnet UA, Lowenstein CJ, Shaul PW. 2000. Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J Biol Chem*. 275(11):8183–8189.
- Gogia S, Neelamegham S. 2015. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology*. 52(5-6):319–335.
- Groeger S, Meyle J. 2019. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 10:208.
- Guo W, Xu W, Wang Z, Chen M, Hao C, Zheng X, Huang J, Sui X, Yuan Z, Zhang Y, et al. 2018. Cell-Free Strategies for Repair and Regeneration of Meniscus Injuries through the Recruitment of Endogenous Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Int*. 2018:5310471.
- Hajicharalambous CS, Lichter J, Hix WT, Swierczewska M, Rubner MF, Rajagopalan P. 2009. Nano- and sub-micron porous polyelectrolyte multilayer assemblies: biomimetic surfaces for human corneal epithelial cells. *Biomaterials*. 30(23-24):4029–4036.
- Heimes D, Wiesmann N, Eckrich J, Brieger J, Mattyasovszky S, Proff P, Weber M, Deschner J, Al-Nawas B, Kämmerer PW. 2020. In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves. *Int J Mol Sci*. 21(20):7574.
- Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Kelm M. 2015. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 22(14):1230–1242.
- Heller M, Bauer H-K, Schwab R, Blatt S, Peters K, Nezi-Cahn S, Unger RE, Hasenburg A, Brenner W. 2020. The impact of intercellular communication for the generation of complex multicellular prevascularized tissue equivalents. *J Biomed Mater Res A*. 108(3):734–748.
- Heller M, Frerick-Ochs EV, Bauer H-K, Schiegnitz E, Flesch D, Brieger J, Stein R, Al-Nawas B, Brochhausen C, Thüroff JW, et al. 2016. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*. 77:207–215.
- Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby KC, Sack U, Krügel U. 2013. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur Cytokine Netw*. 24(2):97–103.
- Hoyer LW. 1981. The factor VIII complex: structure and function. *Blood*. 58(1):1–13.

- Hu C, Ding Y, Chen J, Liu D, Zhang Y, Ding M, Wang G. 2009. Basic fibroblast growth factor stimulates epithelial cell growth and epithelial wound healing in canine corneas. *Vet Ophthalmol.* 12(3):170–175.
- Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, Oh B-H, Lee M-M, Park Y-B. 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(2):288–293.
- Ito T-K, Ishii G, Chiba H, Ochiai A. 2007. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene.* 26(51):7194–7203.
- Jain-Vora S, Wert SE, Temann UA, Rankin JA, Whitsett JA. 1997. Interleukin-4 alters epithelial cell differentiation and surfactant homeostasis in the postnatal mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17(5):541–551.
- Jakubowska W, Chabaud S, Saba I, Galbraith T, Berthod F, Bolduc S. 2020. Prevascularized Tissue-Engineered Human Vaginal Mucosa: In Vitro Optimization and In Vivo Validation. *Tissue Eng Part A.* 26(13-14):811–822.
- Janni W, Hancke K, Fehm T, Scholz C, Rack BK, editors. 2022. *Facharztwissen Gynäkologie. 3. Auflage.* München: Elsevier. 1 Online-Ressource (Facharztwissen). ISBN: 9783437183560.
- Jiang ZL, Zhu X, Diamond MP, Abu-Soud HM, Saed GM. 2008. Nitric oxide synthase isoforms expression in fibroblasts isolated from human normal peritoneum and adhesion tissues. *Fertil Steril.* 90(3):769–774.
- Jones SG, Morrissey K, Williams JD, Phillips AO. 1999. TGF-beta1 stimulates the release of pre-formed bFGF from renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 56(1):83–91.
- Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C. 2003. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Möglichkeiten antiangiogener Therapie [Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?]. *Ophthalmologie.* 100(4):284–291.
- Kang D, Kim JH, Jeong YH, Kwak J-Y, Yoon S, Jin S. 2016. Endothelial monolayers on collagen-coated nanofibrous membranes: cell-cell and cell-ECM interactions. *Biofabrication.* 8(2):025008.
- Kannan S, Balaram P, Chandran GJ, Pillai MR, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK. 1994. Alterations in expression of basement membrane proteins during tumour progression in oral mucosa. *Histopathology.* 24(6):531–537.
- Kellouche S, Mourah S, Bonnefoy A, Schoëvaert D, Podgorniak M-P, Calvo F, Hoylaerts MF, Legrand C, Dosquet C. 2007. Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation. *Exp Cell Res.* 313(3):486–499.
- Khan KM, Scott A. 2009. Mechanotherapy: how physical therapists' prescription of exercise promotes tissue repair. *Br J Sports Med.* 43(4):247–252.
- Kim YH, Bang J-I, Son H-J, Kim Y, Kim JH, Bae H, Han SJ, Yoon H-J, Kim BS. 2019. Protective effects of extracorporeal shockwave on rat chondrocytes and

- temporomandibular joint osteoarthritis; preclinical evaluation with in vivo<sup>99m</sup>Tc-HDP SPECT and ex vivo micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage*. 27(11):1692–1701.
- Kirkland SC, Henderson K. 2001. Collagen IV synthesis is restricted to the enteroendocrine pathway during multilineage differentiation of human colorectal epithelial stem cells. *J Cell Sci*. 114(Pt 11):2055–2064.
- Klotz BJ, Lim KS, Chang YX, Soliman BG, Pennings I, Melchels FPW, Woodfield TBF, Rosenberg AJ, Malda J, Gawlitta D. 2018. Engineering of a complex bone tissue model with endothelialised channels and capillary-like networks. *Eur Cell Mater*. 35:335–348.
- Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Dyszkiewicz-Konwińska M, Piotrowska-Kempisty H, Antosik P, Bukowska D, Bruska M, Iżycki D, et al. 2019. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J Clin Med*. 8(10) 1602.
- Kürzl R. 2010. Vaginalkarzinom. In: Bartram CR, Hiddemann W, Huber H, editors. *Die Onkologie: Epidemiologie ; Pathogenese ; Grundprinzipien der Therapie*. 2., aktualisierte Aufl. Berlin: Springer. p. 1077–1083.
- Laschke MW, Menger MD. 2016. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol Adv*. 34(2):112–121.
- Lauer G, Petzold A, Distler W. 2008. Mikrovaskulärer Gewebettransfer nach ablativer Chirurgie in der Gynäkologie. *Gynäkologe*. 41(12):987–994.
- Leone L, Raffa S, Vetrano M, Ranieri D, Malisan F, Scrofani C, Vulpiani MC, Ferretti A, Torrisi MR, Visco V. 2016. Extracorporeal Shock Wave Treatment (ESWT) enhances the in vitro-induced differentiation of human tendon-derived stem/progenitor cells (hTSPCs). *Oncotarget*. 7(6):6410–6423.
- Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. 2016. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 23(3):253–259.
- Li S, Shipley GD. 1991. Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell Growth Differ*. 2(4):195–202.
- Li Y, Baccouche B, Olayinka O, Serikbaeva A, Kazlauskas A. 2021. The Role of the Wnt Pathway in VEGF/Anti-VEGF-Dependent Control of the Endothelial Cell Barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 62(12):17.
- Liew AWL, Zhang aY. 2017. In vitro pre-vascularization strategies for tissue engineered constructs–Bioprinting and others. *Int J Bioprint*. 3(1) 008.
- Lima Morais TM, Meyer PF, Vasconcellos LS de, E Silva JC, E Andrade IF, Farias VAF de, Da Silva IC, Araújo RMFG, Da Silva RMV, Pacheco EF, et al. 2019. Effects of the extracorporeal shock wave therapy on the skin: an experimental study. *Lasers Med Sci*. 34(2):389–396.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 105(1):71–77.
- Liu J, Mao JJ, Chen L. 2011. Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 17(1):25–31.



- Lopes SV, Collins MN, Reis RL, Oliveira JM, Silva-Correia J. 2021. Vascularization Approaches in Tissue Engineering: Recent Developments on Evaluation Tests and Modulation. *ACS Appl Bio Mater.* 4(4):2941–2956.
- Lovegrove A, Edwards CH, Noni I de, Patel H, El SN, Grassby T, Zielke C, Ulmius M, Nilsson L, Butterworth PJ, Ellis PR, Shewry PR. 2017. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(2):237–253.
- Lu C-C, Chou S-H, Shen P-C, Chou P-H, Ho M-L, Tien Y-C. 2020. Extracorporeal shock wave promotes activation of anterior cruciate ligament remnant cells and their paracrine regulation of bone marrow stromal cells' proliferation, migration, collagen synthesis, and differentiation. *Bone Joint Res.* 9(8):458–468.
- Lucius R, Brockdorff A. 2016. 3 Kreislauf und Gefäßsystem. In: Lucius R, Brockdorff A, editors. *Anatomie-Atlas für Heilpraktiker.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Łuczak A, Madej M, Kasprzyk A, Doroszko A. 2020. Role of the eNOS Uncoupling and the Nitric Oxide Metabolic Pathway in the Pathogenesis of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020:1417981.
- Mai C, Bergholz R, Bertelmann E. 2013. Mundschleimhauttransplantation in der Augenheilkunde. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 230(S 02).
- Markiewicz MR, Margarone JE, Barbagli G, Scannapieco FA. 2007. Oral Mucosa Harvest: An Overview of Anatomic and Biologic Considerations. *EAU-EBU Update Series.* 5(5):179–187.
- Marks JG, Miller JJ. 2019. *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology.* Elsevier Masson. 1 online resource (vol. 6.). ISBN: 978-0-323-43040-1.
- Marques AP, Cruz HR, Coutinho OP, Reis RL. 2005. Effect of starch-based biomaterials on the in vitro proliferation and viability of osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med.* 16(9):833–842.
- Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Pretto M de, Remondini D, Castellani GC. 2005. Shock wave therapy as an innovative technology in skeletal disorders: study on transmembrane current in stimulated osteoblast-like cells. *Int J Artif Organs.* 28(8):841–847.
- Masson-Meyers DS, Bertassoni LE, Tayebi L. 2022. Oral mucosa equivalents, prevascularization approaches, and potential applications. *Connect Tissue Res.* 1–16.
- Matichescu A, Ardelean LC, Rusu L-C, Craciun D, Bratu EA, Babucea M, Leretter M. 2020. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration-A Review. *Materials.* 13(22) 5303.
- Mattyasovszky SG, Langendorf EK, Ritz U, Schmitz C, Schmidtman I, Nowak TE, Wagner D, Hofmann A, Rommens PM, Drees P. 2018. Exposure to radial extracorporeal shock waves modulates viability and gene expression of human skeletal muscle cells: a controlled in vitro study. *J Orthop Surg Res.* 13(1):75.
- Maybin JA, Hirani N, Brown P, Jabbour HN, Critchley HOD. 2011. The regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  during human endometrial repair. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(8):2475–2483.
- Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, Ohneda O, Randi AM, Chan JKY, Yamaguchi T, et al. 2017.

- Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med.* 6(5):1316–1320.
- Medina RJ, O'Neill CL, O'Doherty TM, Knott H, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Stitt AW. 2011. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Mol Med.* 17(9-10):1045–1055.
- Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(6):1031–1037.
- Miron-Mendoza M, Seemann J, Grinnell F. 2008. Collagen fibril flow and tissue translocation coupled to fibroblast migration in 3D collagen matrices. *Mol Biol Cell.* 19(5):2051–2058.
- Mishra R, Roux BM, Posukonis M, Bodamer E, Brey EM, Fisher JP, Dean D. 2016. Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly(propylene fumarate)/fibrin scaffolds. *Biomaterials.* 77:255–266.
- Mittermayr R, Antonic V, Hartinger J, Kaufmann H, Redl H, Téot L, Stojadinovic A, Schaden W. 2012. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy. *Wound Repair Regen.* 20(4):456–465.
- Miyazaki H, Tsunoi Y, Akagi T, Sato S, Akashi M, Saitoh D. 2019. A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment. *Sci Rep.* 9(1):7797.
- Mizia-Malarz A, Sobol G, Woś H. 2008. Czynniki proangiogenne: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)--charakterystyka i funkcje [Proangiogenic factors: vascular-endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor--the characteristics and function]. *Przegl Lek.* 65(7-8):353–357.
- Moharamzadeh K, Brook IM, van Noort R, Scutt AM, Smith KG, Thornhill MH. 2008. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 19(4):1793–1801.
- Moharamzadeh K, Colley H, Murdoch C, Hearnden V, Chai WL, Brook IM, Thornhill MH, Macneil S. 2012. Tissue-engineered oral mucosa. *J Dent Res.* 91(7):642–650.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. 1982. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31(1):11–24.
- Müller H-P, editor. 2012. *Parodontologie. 3., aktualisierte Aufl., Seite 17.* Stuttgart, New York, NY: Thieme. 291 p. (Checklisten der Zahnmedizin). ISBN: 9783131263636.
- Mungadi IA, Ugboko VI. 2009. Oral mucosa grafts for urethral reconstruction. *Ann Afr Med.* 8(4):203–209.
- Nagendran M, Arora P, Gori P, Mulay A, Ray S, Jacob T, Sonawane M. 2015. Canonical Wnt signalling regulates epithelial patterning by modulating levels of laminins in zebrafish appendages. *Development.* 142(11):2080.

- Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, Saito C, Kawano Y, Maeda T. 2007. The expression and production of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 36(10):928–933.
- Nam C-W, Kang S-J, Kang YK, Kwak M-K. 2011. Cell growth inhibition and apoptosis by SDS-solubilized single-walled carbon nanotubes in normal rat kidney epithelial cells. *Arch Pharm Res.* 34(4):661–669.
- Nanci A. 2007. *Oral histology: Development, structure, and function.* 7th ed. St. Louis, Mo., London: Mosby, Seite 327. pages cm. ISBN: 9780323045575.
- Neal RA, McClugage SG, Link MC, Sefcik LS, Ogle RC, Botchwey EA. 2009. Laminin nanofiber meshes that mimic morphological properties and bioactivity of basement membranes. *Tissue Eng Part C Methods.* 15(1):11–21.
- Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F. 2019. Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca<sup>2+</sup> Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front Physiol.* 10:1618.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB j.* 13(1):9–22.
- Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CCW. 2011. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell.* 22(20):3791–3800.
- Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD. 2000. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* 106(3):385–392.
- Njauw C-N, Yuan H, Zheng L, Yao M, Martins-Green M. 2008. Origin of periendothelial cells in microvessels derived from human microvascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(4):710–720.
- Noma K, Smalley KSM, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, El-Deiry W, King AJ, Nakagawa H, Herlyn M. 2008. The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis. *Gastroenterology.* 134(7):1981–1993.
- Ortiz PA, Garvin JL. 2003. Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells. *Acta Physiol Scand.* 179(2):107–114.
- Otto HF, Töndury G, Wanke M, Zeitlhofer J. 2013. *Darm und Peritoneum. Hernien.* Berlin: Springer Berlin. 1 Band (Spezielle pathologische Anatomie / Doerr, W.(Hgs):Spez.path. Anatomie Bd 2; 2 / 2). ISBN: 978-3-642-80599-8.
- Ottomann C, Hartmann B, Tyler J, Maier H, Thiele R, Schaden W, Stojadinovic A. 2010. Prospective randomized trial of accelerated re-epithelization of skin graft donor sites using extracorporeal shock wave therapy. *J Am Coll Surg.* 211(3):361–367.
- Pabst A, Sagheb K, Blatt S, Sagheb K, Schröger S, Wentaschek S, Schumann S. 2022. Biomechanical Characterization of a New Acellular Dermal Matrix for Oral Soft Tissue Regeneration. *J Invest Surg.* 35(6):1296–1303.
- Pan Q, Chathery Y, Wu Y, Rathore N, Tong RK, Peale F, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Koch AW, Watts RJ. 2007. Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem.* 282(33):24049–24056.

- Papaioannou TG, Manolesou D, Dimakakos E, Tsoucalas G, Vavuranakis M, Tousoulis D. 2019. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. *Acta Cardiol Sin.* 35(3):284–289.
- Patan S. 2000. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 50(1-2):1–15.
- Peak CW, Cross L, Singh A, Gaharwar AK. 2016. Microscale Technologies for Engineering Complex Tissue Structures. In: Singh A, Gaharwar AK, editors. *Microscale Technologies for Cell Engineering*. Cham: Springer International Publishing. p. 3–25.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, et al. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 95(3):952–958.
- Piradashvili K, Simon J, Paßlick D, Höhner JR, Mailänder V, Wurm FR, Landfester K. 2017. Fully degradable protein nanocarriers by orthogonal photoclick tetrazole-ene chemistry for the encapsulation and release. *Nanoscale Horiz.* 2(5):297–302.
- Porter SS, Goldberg RJ. 1986. Intraoperative allergic reactions to hydroxyethyl starch: a report of two cases. *Can Anaesth Soc J.* 33(3 Pt 1):394–398.
- Raemer PC, Haemmerling S, Giese T, Canaday DH, Katus HA, Dengler TJ, Sivanandam VG, Shankar SGV. 2009. Endothelial progenitor cells possess monocyte-like antigen-presenting and T-cell-co-stimulatory capacity. *Transplantation.* 87(3):340–349.
- Llopis-Grimalt MA, Munar-Bestard M, Ramis JM, Monjo M. 2018. Tissue-Engineered Oral Mucosa Constructs for in Vitro Research and Clinical Applications. *BJSTR.* 2(3).
- Reinke JM, Sorg H. 2012. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 49(1):35–43.
- Reiß M, editor. 2009. *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie*. Heidelberg: Springer. 1170 p. ISBN: 978-3-540-89440-7.
- Ren, Chen J, Duscher D, Liu Y, Guo G, Kang Y, Xiong H, Zhan P, Wang Y, Wang C, et al. 2019. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Res Ther.* 10(1):47.
- Root LL, Shipley GD. 1991. Human dermal fibroblasts express multiple bFGF and aFGF proteins. *In Vitro Cell Dev Biol.* 27A(10):815–822.
- Said Z, Colley H, Murdoch G. 2019. Construction of a full-thickness of tissue-engineered oral mucosa (TEOM) based on immortalised keratinocytes. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences.* 15(107):49.
- Sasso EB, Thornton ME, Chmait RH, Ouzounian JG, Grubbs BH. 2022. Amylase concentration and activity in the amniotic fluid of fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 35(1):147–154.
- Schaden W, Thiele R, Köpl C, Pusch M, Nissan A, Attinger CE, Maniscalco-Theberge ME, Peoples GE, Elster EA, Stojadinovic A. 2007. Shock wave therapy

- for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study. *J Surg Res.* 143(1):1–12.
- Schmelz H-U, Sparwasser C, Weidner W. 2014. *Facharztwissen Urologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-642-44941-3.
- Schulze C. 2016. Einsatz und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen für die Prävascularisation einer in vitro-Schleimhaut [Diplomarbeit]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schwab R, Heller M, Pfeifer C, Unger RE, Walenta S, Nezi-Cahn S, Al-Nawas B, Hasenburg A, Brenner W. 2021. Full-thickness tissue engineered oral mucosa for genitourinary reconstruction: A comparison of different collagen-based biodegradable membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 109(4):572–583.
- Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. 2006. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 17(4):403–409.
- Shafiee S, Shariatzadeh S, Zafari A, Majd A, Niknejad H. 2021. Recent Advances on Cell-Based Co-Culture Strategies for Prevascularization in Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 9:745314.
- Sierra-Sánchez Á, Kim KH, Blasco-Morente G, Arias-Santiago S. 2021. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. *NPJ Regen Med.* 6(1):35.
- Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. 2019. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost.* 17(7):1190–1194.
- Smirani R, Rémy M, Devillard R, Naveau A. 2020. Engineered Prevascularization for Oral Tissue Grafting: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 26(4):383–398.
- Sondén A, Svensson B, Roman N, Brismar B, Palmblad J, Kjellström BT. 2002. Mechanisms of shock wave induced endothelial cell injury. *Lasers Surg Med.* 31(4):233–241.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. 2007. A self-assembled fibroblast-endothelial cell co-culture system that supports in vitro vasculogenesis by both human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells. *Cells Tissues Organs.* 186(3):157–168.
- Squier C, Brogden K. 2013. *Human oral mucosa: Development, structure and function.* Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell. 1 online resource. ISBN: 9780470959732.
- Squier CA, Kremer MJ. 2001. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (29):7–15.
- Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol.* 85(5):233–248.

- Sturtzel C. 2017. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol.* 1003:71–91.
- Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu J, Peng M. 2010. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 160(4):988–1003.
- Sung P-H, Yin T-C, Chai H-T, Chiang JY, Chen C-H, Huang C-R, Yip H-K. 2022. Extracorporeal Shock Wave Therapy Salvages Critical Limb Ischemia in B6 Mice through Upregulating Cell Proliferation Signaling and Angiogenesis. *Biomedicines.* 10(1): 117.
- Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. 2008. Long-term biodegradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 19(3):295–302.
- Tamma R, dell'Endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, Zallone A, Moretti B. 2009. Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities. *Ultrasound Med Biol.* 35(12):2093–2100.
- Tasev D, Koolwijk P, van Hinsbergh VWM. 2016. Therapeutic Potential of Human-Derived Endothelial Colony-Forming Cells in Animal Models. *Tissue Eng Part B Rev.* 22(5):371–382.
- Taylor HC, Lightner VA, Beyer WF, McCaslin D, Briscoe G, Erickson HP. 1989. Biochemical and structural studies of tenascin/hexabrachion proteins. *J Cell Biochem.* 41(2):71–90.
- Thomas KA. 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* 271(2):603–606.
- Tien J. 2019. Tissue Engineering of the Microvasculature. *Compr Physiol.* 9(3):1155–1212.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 266(18):11947–11954.
- Toledano-Osorio M, Muñoz-Soto E, Toledano M, Vallecillo-Rivas M, Vallecillo C, Ramos-García P, Osorio R. 2022. Treating Gingival Recessions Using Coronally Advanced Flap or Tunnel Techniques with Autografts or Polymeric Substitutes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Polymers.* 14(7): 1453.
- Torras N, García-Díaz M, Fernández-Majada V, Martínez E. 2018. Mimicking Epithelial Tissues in Three-Dimensional Cell Culture Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 6:197.
- Torres Filho IP, Leunig M, Yuan F, Intaglietta M, Jain RK. 1994. Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(6):2081–2085.
- Tremblay P-L, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA. 2005. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant.* 5(5):1002–1010.
- Tschopp TB, Weiss HJ, Baumgartner HR. 1974. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med.* 83(2):296–300.

- Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. 2010. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials*. 31(27):6959–6967.
- Vacanti JP, Langer R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*. 354:S32-S34.
- van Rensburg BGJ. 1995. *Oral biology*. Chicago: Quintessence Publishing. 524 str. (Quintessence books). ISBN: 0867152710.
- Vetrano M, d'Alessandro F, Torrisi MR, Ferretti A, Vulpiani MC, Visco V. 2011. Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 19(12):2159–2168.
- Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A. 2005. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int*. 67(2):449–457.
- Vrana NE, Builles N, Justin V, Bednarz J, Pellegrini G, Ferrari B, Damour O, Hulmes DJS, Hasirci V. 2008. Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49(12):5325–5331.
- Vrana NE, Lavallo P, Dokmeci MR, Dehghani F, Ghaemmaghami AM, Khademhosseini A. 2013. Engineering functional epithelium for regenerative medicine and in vitro organ models: a review. *Tissue Eng Part B Rev*. 19(6):529–543.
- Walser R, Metzger W, Görg A, Pohlemann T, Menger MD, Laschke MW. 2013. Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 26:222–233.
- Wan H, Gadmor H, Brown L. 2018. Cell-Cell Interactions in the Oral Mucosa: Tight Junctions and Gap Junctions. In: Bergmeier LA, editor. *Oral Mucosa in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing. p. 19–30.
- Wang F-S, Wang C-J, Chen Y-J, Chang P-R, Huang Y-T, Sun Y-C, Huang H-C, Yang Y-J, Yang KD. 2004. Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. *J Biol Chem*. 279(11):10331–10337.
- Wang D, Wang E, Liu K, Xia C-H, Li S, Gong X. 2017. Roles of TGF $\beta$  and FGF signals during growth and differentiation of mouse lens epithelial cell in vitro. *Sci Rep*. 7(1):7274.
- Warren BB, Durieux ME. 1997. Hydroxyethyl starch: safe or not? *Anesth Analg*. 84(1):206–212.
- Weihl AM, Fuchs C, Teuschl AH, Hartinger J, Slezak P, Mittermayr R, Redl H, Junger WG, Sitte HH, Rünzler D. 2014. Shock wave treatment enhances cell proliferation and improves wound healing by ATP release-coupled extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J Biol Chem*. 289(39):27090–27104.

- Wong T, McGrath JA, Navsaria H. 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol.* 156(6):1149–1155.
- Wu I, Elisseeff J. 2014. Biomaterials and Tissue Engineering for Soft Tissue Reconstruction. In: *Natural and Synthetic Biomedical Polymers.* Amsterdam: Elsevier. p. 235–241.
- Xu J, Chen H, Li X, Huang Z, Xu H, Yang H, Hu J. 2012. Optimal intensity shock wave promotes the adhesion and migration of rat osteoblasts via integrin  $\beta$ 1-mediated expression of phosphorylated focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 287(31):26200–26212.
- Xu M, Li J, Liu X, Long S, Shen Y, Li Q, Ren L, Ma D. 2019. Fabrication of vascularized and scaffold-free bone tissue using endothelial and osteogenic cells differentiated from bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell.* 61:21–29.
- Yoshida A, Anand-Apte B, Zetter BR. 1996. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors.* 13(1-2):57–64.
- Yoshida M, Kishikawa T. 1984. A Study of Hydroxyethyl Starch. Part II. Degradation-Sites of Hydroxyethyl Starch by Pig Pancreas  $\alpha$ -Amylase. *Starch/Stärke.* 36(5):167–169.
- Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 17(7):4015–4023.
- Yun Y-R, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang J-H, Shin US, Kim H-W. 2010. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010:218142.
- Yurchenco PD. 2011. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(2):a004911.
- Yurchenco PD, Patton BL. 2009. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des.* 15(12):1277–1294.
- Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. 2013. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull.* 3(2):329–332.
- Zarbock A, Buhre W. 2022. Hydroxyethyl Starch in the Perioperative Period: Friend, Foe, or Still an Unsolved Issue? *Anesth Analg.* 134(4):683–685.
- Zarychanski R, Turgeon AF. 2019. Recadrer la question: l'hydroxyéthylamidon doit-il être utilisé en pratique clinique? [Re-framing the question: Should hydroxyethyl starch be used in clinical practice?]. *Can J Anaesth.* 66(1):21–24.
- Zhang W, Wray LS, Rnjak-Kovacina J, Xu L, Zou D, Wang S, Zhang M, Dong J, Li G, Kaplan DL, et al. 2015. Vascularization of hollow channel-modified porous silk scaffolds with endothelial cells for tissue regeneration. *Biomaterials.* 56:68–77.
- Zhang J, Kang N, Yu X, Ma Y, Pang X. 2017. Radial Extracorporeal Shock Wave Therapy Enhances the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells by Notch, PI3K/AKT, and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling. *Sci Rep.* 7(1):15321.



- Zhang X, Yan X, Wang C, Lu S, Tang T, Chai Y. 2014. The effect of autologous endothelial progenitor cell transplantation combined with extracorporeal shock-wave therapy on ischemic skin flaps in rats. *Cytherapy*. 16(8):1098–1109.
- Zugor V, Porres D, Karapanos L, Heidenreich A, Akbarov I. 2017. Rekonstruktive Chirurgie der Harnröhre [Reconstructive urethral surgery]. *Aktuelle Urol*. 48(6):569–575.
- Zurina IM, Shpichka AI, Saburina IN, Kosheleva NV, Gorkun AA, Grebenik EA, Kuznetsova DS, Zhang D, Rochev YA, Butnaru DV, et al. 2018. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro. *Biomed Mater*. 13(5): 054104.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Adipo	Adiponektin
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
bNGF	Basic Nerve Growth Factor
BP	British Pharmacopoeia
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid Dihydrat
CnT	Cell and Tec
d	day, Tag
CAC	Circulating angiogenic cell
CAM	Chorionallantoismembran
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CFU-Hill	Colony forming unit-Hill cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
ECFC	Endothelial colony forming cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endothelial progenitor cells
ESWT	Extrakorporaler Stoßwellentherapie
et al.	et alia, und andere
etc.	et cetera, und so weiter
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
FGFb	Basic Fibroblast Growth Factor
g	g-Kraft

---

GCSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GMCSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
h	hour, Stunde
HDMEC	Human dermal microvascular endothelial cells
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
IF	Immunfluoreszenz
IFN $\gamma$	Interferon Production Regulator
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-Gamma Induced Protein 10
IPA	Isopropylalkohol
k.A.	keine Angabe
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MAC	Myeloide angiogene Zellen
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEK	Methylethylketon
MIP-1 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha
MSH	Mundschleimhaut
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
min	Minute
p.a.	pro analysi, für analytische Zwecke
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia
P/S	Penicillin-Streptomycin

PAC	Proangiogene hämatopoetische Stammzellen
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIGF	Placental Growth Factor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SR-101	Sulforhodamin-101
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
USP	United States Pharmacopeia
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau von humaner, nativer Mundschleimhaut in histologischer und schematischer Darstellung .....	<b>7</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schema der Vaskulogenese. Abbildung verändert nach Peak et al. (Peak et al. 2016) .....	<b>9</b>
<b>Abbildung 3:</b> Schema der Angiogenese. Abbildung verändert nach Peak et al. (Peak et al. 2016) und Jousen et al. (Jousen et al. 2003) .....	<b>10</b>
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung eines Entwicklungsprozesses im Tissue Engineering .....	<b>13</b>
<b>Abbildung 5:</b> Skizzierte Übersicht der Methodenfelder zum Erreichen der Zielsetzung. ....	<b>23</b>

<b>Abbildung 6:</b> Schematische Abbildung der Herstellung des Mundschleimhaut-Äquivalents (Tri-Kultur).....	<b>42</b>
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix im Transwell-System.....	<b>46</b>
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix im Transwell-System.....	<b>47</b>
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur Chemotaxis mit Kollagenmatrix mithilfe von mit Angiogenesefaktoren-versetztem Kollagen I-Gel....	<b>49</b>
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung der ESWT-Anwendung der zellbesiedelten Kollagenmatrices .....	<b>51</b>
<b>Abbildung 11:</b> Darstellung der isolierten Fibroblasten aus humaner Mundschleimhaut. ....	<b>56</b>
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der isolierten Epithelzellen aus humaner Mundschleimhaut. ....	<b>57</b>
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der isolierten humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) aus juveniler Vorhaut. ....	<b>58</b>
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der isolierten endothelialen, kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus Vollblut. ....	<b>59</b>
<b>Abbildung 15:</b> Charakterisierung der endothelialen, kolonieformenden Vorläuferzellen (ECFC) aus dem Vollblut mittels Fluoreszenzfärbung von CD31-, CD14- sowie CD133-Antikörpern (Dreifachfärbung) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Isolation. ....	<b>60</b>
<b>Abbildung 16:</b> Zellviabilität der Fibroblasten auf hydrierten und unhydrierten Kollagenmatrices 4 h und 24 h nach dem Aussäen.....	<b>61</b>
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung der bilayer Struktur der Zell-besiedelten Kollagenmatrix	<b>62</b>
<b>Abbildung 18:</b> Fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Darstellung der Gefäßstrukturen im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 26 und 33.....	<b>63</b>
<b>Abbildung 19:</b> Immunhistochemischen Färbungen von vWF des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 26 und 33.....	<b>64</b>
<b>Abbildung 20:</b> Immunhistochemische Färbung von Tenascin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>64</b>
<b>Abbildung 21:</b> Immunhistochemische Färbung von Involucrin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>65</b>

<b>Abbildung 22:</b> Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 13 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>66</b>
<b>Abbildung 23:</b> Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>66</b>
<b>Abbildung 24:</b> Immunhistochemische Färbung von Occludin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>67</b>
<b>Abbildung 25:</b> Immunhistochemische Färbung von Laminin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>67</b>
<b>Abbildung 26:</b> Immunhistochemische Färbung von Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 12, 26 und 33.....	<b>68</b>
<b>Abbildung 27:</b> VEGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen .....	<b>70</b>
<b>Abbildung 28:</b> bFGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen .....	<b>72</b>
<b>Abbildung 29:</b> IL-8-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen .....	<b>74</b>
<b>Abbildung 30:</b> eNOS-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen .....	<b>76</b>
<b>Abbildung 31:</b> Angiopoietin-2-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen .....	<b>78</b>
<b>Abbildung 32:</b> Sekretion verschiedener Zytokine von Bi- und Tri-Kulturen an Kulturtag 33.....	<b>79</b>
<b>Abbildung 33:</b> Chemotaktische Migration von HDMEC und ECFC in Richtung VEGF-121 in verschiedenen Konzentrationen.....	<b>81</b>
<b>Abbildung 34:</b> HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz unterhalb der Matrix vermittelt über Chemokin-Sekretion von Fibroblasten .....	<b>82</b>
<b>Abbildung 35:</b> HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz unterhalb der Matrix vermittelt über VEGF-121 .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 36:</b> VEGF-121-Freisetzung aus Kollagen I-Gel in darüber liegendes DPBS innerhalb von 7 Tagen. ....	<b>84</b>
<b>Abbildung 37:</b> HDMEC-Lokalisation auf der Kollagenmatrix nach chemotaktischem Reiz vermittelt über mit VEGF-121 versetztes Kollagen I-Gel unterhalb der Kollagenmatrix.....	<b>85</b>

<b>Abbildung 38:</b> Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. ....	<b>87</b>
<b>Abbildung 39:</b> Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. ....	<b>88</b>
<b>Abbildung 40:</b> Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) $\alpha$ -Amylase unter Schütteln nach unterschiedlichen Inkubationszeiten .....	<b>89</b>
<b>Abbildung 41:</b> Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U) $\alpha$ -Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.....	<b>90</b>
<b>Abbildung 42:</b> Zellviabilität von HDMEC bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen .....	<b>91</b>
<b>Abbildung 43:</b> Zellviabilität von Fibroblasten bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen .....	<b>93</b>
<b>Abbildung 44:</b> Zellviabilität von Epithelzellen bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen .....	<b>94</b>
<b>Abbildung 45:</b> Zellviabilität von HDMEC bei $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.....	<b>95</b>
<b>Abbildung 46:</b> Zellviabilität von Fibroblasten bei $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.....	<b>96</b>
<b>Abbildung 47:</b> Zellviabilität von Epithelzellen bei $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.....	<b>97</b>
<b>Abbildung 48:</b> Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung aufgebrochener Stärke- und HES-Nanopartikel mit VEGF-121 .....	<b>99</b>
<b>Abbildung 49:</b> Fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Darstellung der Gefäßstrukturen, sowie Fibroblasten im Mundschleimhaut-Äquivalent an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden. ....	<b>100</b>
<b>Abbildung 50:</b> Immunhistochemische Färbung von Involucrin, Zytokeratin 13, und Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden .....	<b>101</b>

<b>Abbildung 51:</b> Immunhistochemische Färbung von Occludin, Laminin, Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 bei dem HDMEC an Kulturtag 12 injiziert wurden.....	<b>101</b>
<b>Abbildung 52:</b> Zellviabilität von Bi-Kulturen aus Endothelzellen und Fibroblasten oder Tri-Kulturen aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen auf Kollagenmatrices zwei Tage nach der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT)-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26. ....	<b>103</b>
<b>Abbildung 53:</b> Ausbildung von Gefäßstrukturen von HDMEC in Bi- und Tri-Kultur an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26.....	<b>104</b>
<b>Abbildung 54:</b> Ausbildung von Gefäßstrukturen von ECFC in Tri-Kultur an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 19. ....	<b>105</b>
<b>Abbildung 55:</b> Immunhistochemische Färbung von CD31 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>106</b>
<b>Abbildung 56:</b> Immunhistochemische Färbung von vWF des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>107</b>
<b>Abbildung 57:</b> Immunhistochemische Färbung von Tenascin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>108</b>
<b>Abbildung 58:</b> Immunhistochemische Färbung von Involucrin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>109</b>
<b>Abbildung 59:</b> Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 13 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26 .....	<b>110</b>
<b>Abbildung 60:</b> Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26 .....	<b>111</b>
<b>Abbildung 61:</b> Immunhistochemische Färbung von Occludin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>112</b>
<b>Abbildung 62:</b> Immunhistochemische Färbung von Laminin des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26	<b>113</b>
<b>Abbildung 63:</b> Immunhistochemische Färbung von Kollagen IV des Mundschleimhaut-Äquivalents an Kulturtag 33 nach ESWT-Anwendung an Kulturtag 15, 19 oder 26 .....	<b>114</b>



<b>Abbildung 64:</b> Immunhistochemische CD31 und vWF-Färbung des Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>116</b>
<b>Abbildung 65:</b> Immunhistochemische CD31-Färbung des mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33 .....	<b>117</b>
<b>Abbildung 66:</b> Immunhistochemische vWF-Färbung des mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Mundschleimhaut-Äquivalents mit HDMEC oder ECFC nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>118</b>
<b>Abbildung 67:</b> Immunhistochemische Tenascin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>119</b>
<b>Abbildung 68:</b> Immunhistochemische Tenascin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>120</b>
<b>Abbildung 69:</b> Immunhistochemische Involucrin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>121</b>
<b>Abbildung 70:</b> Immunhistochemische Involucrin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>122</b>
<b>Abbildung 71:</b> Immunhistochemische Zytokeratin 13-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>123</b>
<b>Abbildung 72:</b> Immunhistochemische Zytokeratin 13-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>124</b>
<b>Abbildung 73:</b> Immunhistochemische Zytokeratin 19-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>125</b>
<b>Abbildung 74:</b> Immunhistochemische Zytokeratin 19-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>126</b>
<b>Abbildung 75:</b> Immunhistochemische Occludin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>127</b>

<b>Abbildung 76:</b> Immunhistochemische Occludin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>128</b>
<b>Abbildung 77:</b> Immunhistochemische Laminin-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>129</b>
<b>Abbildung 78:</b> Immunhistochemische Laminin-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>130</b>
<b>Abbildung 79:</b> Immunhistochemische Kollagen IV-Färbung von Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 12 .....	<b>131</b>
<b>Abbildung 80:</b> Immunhistochemische Kollagen IV-Färbung von mit Stoßwellen behandelten oder unbehandelten Bi- und Tri-Kulturen auf der Kollagenmatrix nach dem Übersiedeln auf die CAM an Kulturtag 33.....	<b>132</b>

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben .....	<b>24</b>
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Lösungen und Puffer samt ihrer jeweiligen Zusammensetzung .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Zusätze der Zellkulturmedien und ihre jeweilige Zusammensetzung .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Zellkulturmedien mit der jeweiligen Zusammensetzung .....	<b>27</b>
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete ELISA-Kits mit Herstellerangaben.....	<b>28</b>
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Microbeads mit Herstellerangaben.....	<b>28</b>
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Antikörper samt Informationen zur Spezies und Anwendung, sowie Herstellerangaben .....	<b>28</b>
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben .....	<b>29</b>
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangaben .....	<b>31</b>
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Geräte mit Herstellerangaben .....	<b>31</b>
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Software mit Herstellerangaben .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Primärzellen mit den jeweiligen Isolationsgeweben .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 13:</b> Unterschiedliche Verbrauchsmaterialien, die vor ihrer Besiedlung mit Endothelzellen mit verschiedenen Volumen einer Gelatine-Lösung (2 mg/ml) beschichtet wurden.....	<b>34</b>
<b>Tabelle 14:</b> Reihenfolge und Zellkonzentration der Besiedlung der Kollagenmatrix	<b>41</b>

<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung des Kollagen I-Gels mit einer Kollagen I-Konzentration von 3 mg/ml.....	<b>48</b>
<b>Tabelle 16:</b> Aufsteigende Alkoholreihe zur Einbettung der fixierten Kollagenmatrices in Paraffin .....	<b>53</b>
<b>Tabelle 17:</b> Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinisierung der Schnitte der Kollagenmatrices .....	<b>54</b>
<b>Tabelle 18:</b> Aufsteigende Alkoholreihe zum Eindecken der immunhistochemisch gefärbten Kollagenmatrices .....	<b>55</b>

#### 6.4 Werte der Abbildungen

Werte der **Abbildung 16:** Zellviabilität der Fibroblasten auf hydrierten und unhydrierten Kollagenmatrices 4 h und 24 h nach dem Aussäen.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
<b>unhydriert nach 4 h</b>	100	0	
<b>unhydriert nach 24 h</b>	100	0	
<b>hydriert nach 4 h</b>	167,15	5,87	0,002
<b>hydriert nach 24 h</b>	136,02	34,88	

Werte der **Abbildung 27 A:** VEGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Tri-Kultur jeweils im Bezug zur Bi-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	4,25	0,43	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	3,77	0,75	
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	3,87	0,27	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	1,79	0,46	0,024
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	4,15	0,15	

Kulturtag 19 Tri-Kultur	1,93	0,40	0,012
Kulturtag 23 Bi-Kultur	3,72	0,16	
Kulturtag 23 Tri-Kultur	1,49	0,53	0,020
Kulturtag 27 Bi-Kultur	3,51	0,37	
Kulturtag 27 Tri-Kultur	1,52	0,77	
Kulturtag 31 Bi-Kultur	3,94	0,08	
Kulturtag 31 Tri-Kultur	1,58	0,98	0,046
Kulturtag 33 Bi-Kultur	3,49	0,26	
Kulturtag 33 Tri-Kultur	1,44	0,93	0,034

Werte der **Abbildung 27 B**: VEGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	3,04	0,27
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	3,03	0,05
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	3,11	0,09
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	2,36	0,46
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	3,11	0,17
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	2,31	0,49
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	2,89	0,10
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	2,14	0,58
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	3,02	0,07
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	2,20	0,44
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	3,13	0,01
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	2,42	0,54
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	3,02	0,11
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	2,15	0,62

Werte der **Abbildung 28 A**: bFGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Bi- oder Tri-Kultur jeweils im Bezug zur Mono- oder Bi-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	0,19	0,06	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	1,40	0,13	0,002
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	0,66	0,14	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	1,32	0,22	0,043
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	0,59	0,29	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	1,12	0,20	
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	0,33	0,15	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	0,71	0,18	
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	0,95	0,43	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	0,61	0,07	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	0,56	0,23	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	0,48	0,16	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	0,31	0,12	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	0,33	0,08	

Werte der **Abbildung 28 B**: bFGF-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Bi-Kultur jeweils im Bezug zur Mono-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	0,17	0,05	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	1,29	0,28	0,023
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	0,91	0,24	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	1,46	0,15	
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	1,00	0,48	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	1,25	0,16	
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	1,11	0,53	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	0,81	0,12	
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	1,28	0,25	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	0,81	0,04	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	0,73	0,29	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	0,52	0,07	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	0,44	0,08	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	0,70	0,39	

Werte der **Abbildung 29 A**: IL-8-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Bi-Kultur jeweils im Bezug zur Mono-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	2,92	0,01	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	2,84	0,03	0,019
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	2,86	0,02	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	2,86	0,06	
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	2,93	0,09	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	2,89	0,07	
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	2,88	0,03	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	2,88	0,04	
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	2,91	0,06	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	2,86	0,05	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	2,86	0,03	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	2,89	0,11	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	2,87	0,01	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	2,86	0,21	

Werte der **Abbildung 29 B**: IL-8-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	2,87	0,05
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	2,86	0,03
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	2,85	0,04
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	2,92	0,03
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	2,87	0,04
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	2,83	0,02
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	2,87	0,04
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	2,86	0,03
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	2,89	0,05
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	2,89	0,04
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	2,87	0,05
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	2,87	0,04
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	2,91	0,02
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	2,90	0,04

Werte der **Abbildung 30 A**: eNOS-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Tri-Kultur jeweils im Bezug zur Bi-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	294,72	41,47	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	454,27	72,33	
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	418,81	169,58	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	332,81	192,83	
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	413,12	56,59	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	283,46	60,59	0,001
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	352,88	151,54	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	390,77	57,59	



<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	394,99	20,49	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	233,63	180,25	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	321,79	105,30	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	321,31	76,09	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	390,55	74,17	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	254,02	88,87	0,006

Werte der **Abbildung 30 B**: eNOS-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	537,55	80,33
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	575,77	56,41
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	573,72	73,12
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	546,73	92,76
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	523,90	62,09
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	516,90	80,63
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	561,70	55,14
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	534,02	84,63
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	505,18	127,12
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	548,22	90,54
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	557,38	48,29
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	496,06	90,61
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	572,06	97,82
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	472,55	57,94

Werte der **Abbildung 31 A**: Angiopoietin-2-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Tri-Kultur jeweils im Bezug zur Bi-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	0,10	0,07	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	0,10	0,01	
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	12,91	0,73	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	9,93	4,15	
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	11,91	1,52	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	4,35	3,74	
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	6,49	1,241	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	1,50	1,15	0,008
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	6,43	4,04	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	0,75	0,49	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	4,58	4,24	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	0,24	0,21	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	3,29	3,29	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	0,18	0,04	

Werte der **Abbildung 31 B**: Angiopoietin-2-Sekretion von Bi- und Tri-Kulturen an verschiedenen Kulturtagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Bi-Kultur jeweils im Bezug zur Mono-Kultur vom selben Kulturtag wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>Kulturtag 12 Mono-Kultur</b>	0,452	0,04	
<b>Kulturtag 12 Bi-Kultur</b>	0,352	0,04	0,023
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	2,274	1,89	
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	2,891	1,55	
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	2,22	2,37	
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	2,498	2,44	
<b>Kulturtag 23 Bi-Kultur</b>	1,32	1,23	
<b>Kulturtag 23 Tri-Kultur</b>	1,97	2,13	
<b>Kulturtag 27 Bi-Kultur</b>	0,71	0,49	
<b>Kulturtag 27 Tri-Kultur</b>	1,53	1,57	
<b>Kulturtag 31 Bi-Kultur</b>	0,65	0,44	
<b>Kulturtag 31 Tri-Kultur</b>	0,99	0,87	
<b>Kulturtag 33 Bi-Kultur</b>	0,57	0,21	
<b>Kulturtag 33 Tri-Kultur</b>	0,73	0,52	

Werte der **Abbildung 32**: Sekretion verschiedener Zytokine von Bi- und Tri-Kulturen an Kulturtag 33.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse der Tri-Kultur jeweils im Bezug zur Bi-Kultur wieder.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
<b>Bi-Kultur</b>	100	0	
<b>Adipo Tri-Kultur</b>	35,53	21,17	
<b>b-NGF Tri-Kultur</b>	48,79	35,73	
<b>EGF Tri-Kultur</b>	27,29	6,48	0,040
<b>Eotaxin Tri-Kultur</b>	49,21	29,62	
<b>FGFb Tri-Kultur</b>	40,32	37,99	
<b>GCSF Tri-Kultur</b>	120,18	78,89	
<b>GMCSF Tri-Kultur</b>	60,39	32,49	
<b>IFN<math>\gamma</math> Tri-Kultur</b>	97,04	72,68	
<b>IGF-1 Tri-Kultur</b>	40,86	29,98	
<b>IL-10 Tri-Kultur</b>	37,40	39,38	
<b>IL12 Tri-Kultur</b>	37,78	19,62	
<b>IL-13 Tri-Kultur</b>	43,89	13,46	
<b>IL17a Tri-Kultur</b>	62,82	11,49	
<b>IL-1a Tri-Kultur</b>	48,49	29,95	
<b>IL-1b Tri-Kultur</b>	73,02	22,51	
<b>IL-2 Tri-Kultur</b>	85,87	1,84	
<b>IL-4 Tri-Kultur</b>	73,05	0,10	0,002
<b>IL-6 Tri-Kultur</b>	86,78	4,671	
<b>IL-8 Tri-Kultur</b>	72,67	44,76	
<b>IP-10 Tri-Kultur</b>	61,35	48,42	
<b>Leptin Tri-Kultur</b>	46,19	35,25	
<b>MCP-1 Tri-Kultur</b>	71,59	16,49	
<b>MIP-1a Tri-Kultur</b>	79,23	17,73	
<b>PAI-1 Tri-Kultur</b>	44,41	23,30	
<b>PDGF Tri-Kultur</b>	40,29	26,24	
<b>PIGF Tri-Kultur</b>	59,29	14,90	
<b>Rantes Tri-Kultur</b>	72,94	25,43	
<b>Resistin Tri-Kultur</b>	36,56	20,56	
<b>SCF Tri-Kultur</b>	50,39	37,31	
<b>TGF-<math>\beta</math> Tri-Kultur</b>	64,16	23,30	
<b>TNF<math>\alpha</math> Tri-Kultur</b>	67,98	16,22	
<b>VEGF Tri-Kultur</b>	35,79	25,39	

Werte der **Abbildung 33 A**: Chemotaktische Migration von HDMEC und ECFC in Richtung VEGF-121 in verschiedenen Konzentrationen.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
<b>Kontrolle</b>	100	0	
<b>5 ng/ml</b>	136,61	6,88	0,012
<b>10 ng/ml</b>	171,37	6,584	0,003
<b>25 ng/ml</b>	194,89	6,96	0,002
<b>50 ng/ml</b>	183,58	11,93	0,007
<b>100 ng/ml</b>	237,69	73,12	

Werte der **Abbildung 33 B**: Chemotaktische Migration von HDMEC und ECFC in Richtung VEGF-121 in verschiedenen Konzentrationen.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
<b>Kontrolle</b>	100	0	
<b>5 ng/ml</b>	118,84	13,37	
<b>10 ng/ml</b>	120,55	17,88	
<b>25 ng/ml</b>	113,23	21,39	
<b>50 ng/ml</b>	118,08	20,59	
<b>100 ng/ml</b>	120,21	1,56	0,035

Werte der **Abbildung 36**: VEGF-121-Freisetzung aus Kollagen I-Gel in darüber liegendes DPBS innerhalb von 7 Tagen.

	Mittelwert	Standardabweichung
<b>1 min</b>	38,25	14,80
<b>5 min</b>	185,92	188,06
<b>10 min</b>	121,59	63,89
<b>1 h</b>	253,93	6,65
<b>3 h</b>	367,79	33,27
<b>6 h</b>	395,93	0,58
<b>12 h</b>	383,21	48,02
<b>24 h</b>	428,62	21,97
<b>48 h</b>	392,29	19,42
<b>3 d</b>	457,12	53,87
<b>4 d</b>	445,09	8,49
<b>5 d</b>	422,99	19,12
<b>6 d</b>	476,52	113,76
<b>7 d</b>	414,24	18,63

Werte der **Abbildung 38**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	128,89	2,49
<b>5 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	134,46	6,92
<b>10 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	137,12	8,71
<b>1 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	138,47	8,89
<b>3 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	147,53	16,37
<b>6 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	148,43	13,14
<b>12 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	151,66	17,62
<b>24 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	154,72	18,99
<b>48 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	156,09	14,16
<b>3 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	171,98	8,52
<b>4 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	172,02	7,51
<b>5 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	175,67	9,53
<b>6 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	173,78	4,16
<b>7 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	178,21	6,65
<b>1 min 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	159,25	21,89
<b>5 min 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	167,97	28,37
<b>10 min 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	172,82	16,39
<b>1 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	177,01	9,84
<b>3 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	180,12	14,39
<b>6 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	180,41	9,82
<b>12 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	199,41	11,11
<b>24 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	187,03	11,32
<b>48 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	197,38	16,83
<b>3 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	214,51	21,90
<b>4 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	217,28	20,91
<b>5 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	231,49	22,19
<b>6 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	218,66	21,45
<b>7 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	224,36	12,26
<b>1 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	192,25	25,86
<b>5 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	218,63	39,31
<b>10 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	218,19	29,06
<b>1 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	275,46	47,29
<b>3 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	311,59	51,52
<b>6 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	329,11	34,76
<b>12 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	349,21	55,54
<b>24 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	344,98	62,74
<b>48 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	324,76	49,35
<b>3 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	325,68	53,96

4 d 11,57 U $\alpha$ -Amylase	283,77	31,13
5 d 11,57 U $\alpha$ -Amylase	293,65	24,76
6 d 11,57 U $\alpha$ -Amylase	314,84	38,59
7 d 11,57 U $\alpha$ -Amylase	313,38	30,54
1min 115,7 U $\alpha$ -Amylase	220,53	34,22
5 min 115,7 U $\alpha$ -Amylase	252,71	46,97
10 min 115,7 U $\alpha$ -Amylase	267,46	33,02
1 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	319,27	51,38
3 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	355,60	51,17
6 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	339,89	33,39
12 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	356,67	42,64
24 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	341,95	51,27
48 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	324,32	42,89
3 d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	335,27	46,96
4 d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	292,89	33,18
5 d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	302,40	16,91
6 d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	317,59	19,12
7d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	316,39	29,91

Werte der **Abbildung 39**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	Mittelwert	Standardabweichung
1 min 0 U $\alpha$ -Amylase	130,49	1,84
5 min 0 U $\alpha$ -Amylase	136,68	6,89
10 min 0 U $\alpha$ -Amylase	135,76	5,42
1 h 0 U $\alpha$ -Amylase	141,28	3,27
3 h 0 U $\alpha$ -Amylase	139,71	3,45
6 h 0 U $\alpha$ -Amylase	143,03	4,92
12 h 0 U $\alpha$ -Amylase	138,37	8,22
24 h 0 U $\alpha$ -Amylase	147,83	8,167
48 h 0 U $\alpha$ -Amylase	151,27	11,04
3 d 0 U $\alpha$ -Amylase	159,76	7,69
4 d 0 U $\alpha$ -Amylase	152,64	9,18
5 d 0 U $\alpha$ -Amylase	150,22	1,59
6 d 0 U $\alpha$ -Amylase	166,68	5,20
7 d 0 U $\alpha$ -Amylase	167,03	2,40
1 min 1,157 U $\alpha$ -Amylase	142,37	10,17
5 min 1,157 U $\alpha$ -Amylase	150,84	9,69
10 min 1,157 U $\alpha$ -Amylase	150,21	6,49
1 h 1,157 U $\alpha$ -Amylase	157,83	3,22
3 h 1,157 U $\alpha$ -Amylase	158,61	4,06

<b>6 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	156,12	7,57
<b>12 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	158,84	9,58
<b>24 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	165,58	2,64
<b>48 h 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	171,02	8,01
<b>3 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	177,81	13,39
<b>4 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	175,13	6,99
<b>5 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	186,81	13,07
<b>6 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	178,54	13,08
<b>7 d 1,157 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	177,80	15,19
<b>1 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	158,44	13,34
<b>5 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	177,15	22,87
<b>10 min 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	177,91	19,03
<b>1 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	220,18	29,74
<b>3 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	249,59	31,12
<b>6 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	255,66	29,36
<b>12 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	256,30	51,04
<b>24 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	276,07	41,11
<b>48 h 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	268,39	38,27
<b>3 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	261,00	41,31
<b>4 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	221,21	20,33
<b>5 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	225,05	11,33
<b>6 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	250,05	27,07
<b>7 d 11,57 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	243,42	20,67
<b>1min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	178,59	16,56
<b>5 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	199,41	28,47
<b>10 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	204,70	30,34
<b>1 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	253,96	36,49
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	274,95	32,77
<b>6 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	274,96	33,76
<b>12 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	268,08	56,59
<b>24 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	277,18	39,47
<b>48 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	265,66	35,59
<b>3 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	263,12	35,96
<b>4 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	223,69	22,23
<b>5 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	226,86	8,25
<b>6 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	244,77	20,69
<b>7d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	249,28	26,04



Werte der **Abbildung 40 A**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase unter Schütteln nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	163,02	70,04
<b>3 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	124,57	4,01
<b>3 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	141,96	9,76
<b>7 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	129,49	9,68
<b>1 min 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	266,91	57,14
<b>3 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	439,28	116,11
<b>3 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	520,56	75,13
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	424,29	102,70
<b>1 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	306,68	62,81
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	464,24	69,11
<b>3 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	484,52	78,41
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	400,54	105,20

Werte der **Abbildung 40 B**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase unter Schütteln nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	166,79	64,87
<b>3 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	129,66	4,92
<b>3 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	133,41	11,92
<b>7 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	134,61	5,29
<b>1 min 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	205,96	40,01
<b>3 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	287,94	29,34
<b>3 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	324,85	103,60
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	338,09	7,36
<b>1 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	230,15	20,49
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	320,28	29,25
<b>3 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	310,31	85,32
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	347,98	8,67

Werte der **Abbildung 41 A**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	300,38	38,39
<b>3 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	488,14	47,88
<b>3 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	325,69	86,84
<b>7 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	652,41	88,88
<b>1 min 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	355,52	5,40
<b>3 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	429,51	55,48
<b>3 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	456,51	148,567
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	572,11	181,13
<b>1 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	380,37	14,49
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	474,16	63,65
<b>3 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	385,99	78,66
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	523,59	53,29

Werte der **Abbildung 41 B**: Die mittlere Fluoreszenzintensität von freiem Sulforhodamin-101 (SR-101) aus Stärke- sowie HES-Nanopartikeln nach verschiedenen Maßeinheiten (Units; U)  $\alpha$ -Amylase unter Schütteln mit Rührstäbchen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 min 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	267,62	2,23
<b>3 h 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	329,04	38,87
<b>3 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	274,31	34,02
<b>7 d 0 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	396,97	56,78
<b>1 min 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	267,58	6,14
<b>3 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	346,99	44,84
<b>3 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	289,14	71,59
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	332,52	34,15
<b>1 min 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	262,12	4,98
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	334,66	33,49
<b>3 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	286,67	67,78
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	313,89	12,90

Werte der **Abbildung 42 A**: Zellviabilität von HDMEC bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	100,66	51,12
<b>6 h unbehandelt</b>	117,06	18,46
<b>24 h unbehandelt</b>	197,34	38,21
<b>48 h unbehandelt</b>	327,05	85,31
<b>7 d unbehandelt</b>	435,09	164,19
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	81,94	33,58
<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	77,32	50,54
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	70,45	51,38
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	102,09	62,82
<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	150,27	114,10
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	328,49	108,26
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	75,65	45,87
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	81,29	57,02
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	72,71	47,78
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	98,18	64,21
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	153,15	113,09
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	337,29	95,91
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	75,29	46,40
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	77,18	61,13
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	72,88	54,79
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	88,73	53,43

<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	140,49	144,25
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	264,73	130,55

Werte der **Abbildung 42 B**: Zellviabilität von HDMEC bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	78,37	28,89
<b>6 h unbehandelt</b>	109,83	16,21
<b>24 h unbehandelt</b>	179,61	13,09
<b>48 h unbehandelt</b>	289,03	64,33
<b>7 d unbehandelt</b>	441,65	179,62
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	105,04	16,78
<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	74,049	36,63
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	110,61	18,04
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	161,13	18,56
<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	252,74	48,24
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	352,11	101,39
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	99,67	16,39
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	80,56	28,26
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	120,37	14,89
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	134,91	71,55
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	216,32	88,46
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	310,27	96,71
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	94,13	23,25

<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	76,11	38,89
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	89,15	29,50
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	100,89	63,88
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	186,82	115,29
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	282,84	70,56

Werte der **Abbildung 43 A**: Zellviabilität von Fibroblasten bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	120,35	51,26
<b>6 h unbehandelt</b>	139,02	47,80
<b>24 h unbehandelt</b>	183,62	60,27
<b>48 h unbehandelt</b>	203,17	30,59
<b>7 d unbehandelt</b>	312,46	158,75
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	88,04	30,08
<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	108,39	64,78
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	124,62	44,39
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	147,27	74,72
<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	168,33	64,63
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	279,46	132,15
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	80,36	23,14
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	92,52	44,10
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	113,72	37,01
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	124,33	42,41

<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	152,93	62,11
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	270,31	112,83
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	81,83	19,77
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	79,00	25,26
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	101,12	36,09
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	103,07	3,56
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	138,85	48,09
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	229,93	96,93

Werte der **Abbildung 43 B**: Zellviabilität von Fibroblasten bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	115,18	35,07
<b>6 h unbehandelt</b>	113,86	8,58
<b>24 h unbehandelt</b>	178,89	51,09
<b>48 h unbehandelt</b>	204,35	6,99
<b>7 d unbehandelt</b>	300,58	145,90
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	88,59	16,35
<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	109,64	56,93
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	115,01	37,93
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	165,17	63,09
<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	195,44	25,26
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	283,48	156,34
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	74,51	5,59

<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	111,19	59,05
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	108,16	27,44
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	144,15	46,85
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	178,96	30,19
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	257,63	145,69
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	79,94	6,40
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	92,39	40,28
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	93,02	13,98
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	132,13	45,42
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	181,28	24,44
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	256,34	116,29

Werte der **Abbildung 44 A**: Zellviabilität von Epithelzellen bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	100,44	37,00
<b>6 h unbehandelt</b>	108,46	15,41
<b>24 h unbehandelt</b>	52,22	1,012
<b>48 h unbehandelt</b>	168,34	140,13
<b>7 d unbehandelt</b>	186,23	141,09
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	99,02	30,66
<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	142,65	108,83
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	98,24	15,65
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	65,49	1,68

<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	242,85	214,09
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	139,31	98,74
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	212,25	165,71
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	112,39	45,39
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	103,12	28,12
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	95,28	6,99
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	161,81	98,12
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	87,67	21,44
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	179,89	154,48
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	97,60	51,56
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	90,93	11,98
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	95,91	13,19
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	247,99	268,25
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	110,39	72,87

Werte der **Abbildung 44 B**: Zellviabilität von Epithelzellen bei Stärke-sowie HES-Nanopartikel-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0
<b>3 h unbehandelt</b>	98,27	37,11
<b>6 h unbehandelt</b>	115,21	16,56
<b>24 h unbehandelt</b>	52,22	1,01
<b>48 h unbehandelt</b>	168,34	140,13
<b>7 d unbehandelt</b>	186,23	141,09
<b>1 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	88,15	16,24



<b>3 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	128,32	65,81
<b>6 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	101,07	20,02
<b>24 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	68,78	1,26
<b>48 h Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	172,58	137,53
<b>7 d Nanopartikelmenge für 0,5 ng/ml VEGF-121</b>	158,36	140,31
<b>1 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	102,13	42,93
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	70,01	27,51
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	109,23	29,58
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	76,21	17,89
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	170,10	127,42
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	182,30	109,01
<b>1 h Nanopartikelmenge für 5 ng/ml VEGF-121</b>	93,09	43,96
<b>3 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	179,77	158,98
<b>6 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	99,62	18,50
<b>24 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	72,68	23,086
<b>48 h Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	255,75	226,05
<b>7 d Nanopartikelmenge für 2,5 ng/ml VEGF-121</b>	132,42	73,88

Werte der **Abbildung 45**: Zellviabilität von HDMEC bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse jeweils im Bezug zur unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes wieder.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
1 h unbehandelt	100	0	
3 h unbehandelt	105,88	32,38	
6 h unbehandelt	114,81	9,49	
24 h unbehandelt	189,05	24,13	
48 h unbehandelt	231,34	223,98	
7 d unbehandelt	360,46	86,85	
1 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	112,68	12,68	
3 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	107,30	26,89	
6 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	112,22	14,36	
24 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	200,42	35,37	
48 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	194,22	191,77	
7 d 11,5 U $\alpha$ -Amylase	377,01	109,42	
1 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	86,56	30,73	
3 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	100,43	27,92	
6 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	71,88	19,80	0,035
24 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	59,96	21,87	0,011
48 h 115,7 U $\alpha$ -Amylase	32,78	31,74	
7 d 115,7 U $\alpha$ -Amylase	35,98	46,59	0,0144

Werte der **Abbildung 46**: Zellviabilität von Fibroblasten bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse jeweils im Bezug zur unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes wieder.

	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert (signifikantes Ergebnis)
1 h unbehandelt	100	0	
3 h unbehandelt	97,67	3,98	
6 h unbehandelt	103,30	1,66	
24 h unbehandelt	144,24	8,95	
48 h unbehandelt	197,80	7,46	
7 d unbehandelt	199,46	25,59	
1 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	89,16	9,51	
3 h 11,5 U $\alpha$ -Amylase	93,76	18,05	

<b>6 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	94,64	12,34	
<b>24 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	126,72	3,70	
<b>48 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	153,83	34,79	
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	168,79	23,44	
<b>1 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	75,72	19,08	
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	83,76	36,91	
<b>6 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	44,22	8,47	0,004
<b>24 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	65,32	4,73	0,001
<b>48 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	69,62	10,26	0,005
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	67,08	3,28	0,013

Werte der **Abbildung 47**: Zellviabilität von Epithelzellen bei  $\alpha$ -Amylase-Behandlung nach verschiedenen Behandlungsdauern innerhalb von 7 Tagen.

Die angegebenen p-Werte geben signifikante Ergebnisse jeweils im Bezug zur unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes wieder.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert (signifikantes Ergebnis)</b>
<b>1 h unbehandelt</b>	100	0	
<b>3 h unbehandelt</b>	51,18	2,78	
<b>6 h unbehandelt</b>	106,72	6,45	
<b>24 h unbehandelt</b>	41,11	30,50	
<b>48 h unbehandelt</b>	219,07	175,47	
<b>7 d unbehandelt</b>	163,55	119,95	
<b>1 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	102,68	20,84	
<b>3 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	69,91	48,80	
<b>6 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	98,46	58,76	
<b>24 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	57,16	44,74	
<b>48 h 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	175,51	92,05	
<b>7 d 11,5 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	74,18	10,88	
<b>1 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	102,18	35,05	
<b>3 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	70,56	42,83	
<b>6 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	49,88	10,38	0,008
<b>24 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	20,39	10,12	
<b>48 h 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	96,63	67,76	
<b>7 d 115,7 U <math>\alpha</math>-Amylase</b>	43,72	43,34	

Werte der **Abbildung 48**: Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung aufgebrochener Stärke- und HES-Nanopartikel mit VEGF-121.

	<b>Mittelwert</b>
<b>Kontrolle</b>	100
<b>25 ng/ml VEGF-121</b>	166,36
<b><math>\alpha</math>-Amylase-behandelt Stärke-Nanopartikel</b>	3,71
<b><math>\alpha</math>-Amylase-behandelt HES-Nanopartikel</b>	1,16
<b>Mechanische Gewalt Stärke-Nanopartikel</b>	13,61
<b>Mechanische Gewalt HES-Nanopartikel</b>	8,11

Werte der **Abbildung 52 A**: Zellviabilität von Bi-Kulturen aus Endothelzellen und Fibroblasten oder Tri-Kulturen aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen auf Kollagenmatrices zwei Tage nach der extrakorporalen Stoßwellenbehandlung (ESWT) an Kulturtag 15, 19 oder 26.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Kontrolle Bi-Kultur</b>	100	0
<b>Kontrolle Tri-Kultur</b>	100	0
<b>Kulturtag 15 Bi-Kultur</b>	95,54	22,73
<b>Kulturtag 15 Tri-Kultur</b>	86,45	7,07
<b>Kulturtag 19 Bi-Kultur</b>	105,62	11,29
<b>Kulturtag 19 Tri-Kultur</b>	109,22	4,12
<b>Kulturtag 26 Bi-Kultur</b>	105,44	27,55
<b>Kulturtag 26 Tri-Kultur</b>	124,45	39,13

Werte der **Abbildung 52 B**: Zellviabilität von Bi-Kulturen aus Endothelzellen und Fibroblasten oder Tri-Kulturen aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen auf Kollagenmatrices zwei Tage nach der extrakorporalen Stoßwellenbehandlung (ESWT) an Kulturtag 15, 19 oder 26.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Kontrolle</b>	100	0
<b>Kulturtag 19</b>	103,24	20,32

## 6.5 Dissertationsbezogene Publikationen und Posterbeiträge

### 6.5.1 Publikationen

**Peters K**, Wiesmann N, Heimes D, Schwab R, Kämmerer PW, Al-Nawas B, Unger RE, Hasenburg A, Brenner W. Extracorporeal Shock Wave Therapy Improves In Vitro Formation of Multilayered Epithelium of Oral Mucosa Equivalents. 2022. *Biomedicines*, 10(3), 700.

### 6.5.2 Posterbeiträge

**Peters K**, Wiesmann N, Heimes D, Schwab R, Kämmerer P, Brenner W. Einfluss von extrakorporalen Stoßwellen auf die Epithelausbildung bei Schleimhaut-Äquivalenten. BiomaTICS Nikolaus-Symposium, Dezember 06, 2021, Mainz.

**Peters K**, Wurm F, Unger R, Bartsch G, Kämmerer P, Brenner W, Heller M. 3D Pre-vascularization of soft tissue equivalents using HES nanocarrier. 3D Druck Symposium "Advances in 3D Printing. May 10, 2019, Mainz.

# Lebenslauf

---

in der elektronischen Version entfernt

in der elektronischen Version entfernt

in der elektronischen Version entfernt



Danksagung

in der elektronischen Version entfernt

in der elektronischen Version entfernt

## Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Ich habe keine entgeltliche Hilfe Dritter in Anspruch genommen.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit weder komplett noch in Teilen als eine andere staatliche oder wissenschaftliche Prüfung und auch nicht bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Katharina Astrid Peters

Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 2018 bis August 2022 in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von [REDACTED] angefertigt.