

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Integration prävaskularisierter Weichgewebe-Äquivalente *in vivo*

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

Vorgelegt von

Maxi Bischoff aus Sömmerda

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

16.05.2023

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung/Zielsetzung.....	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1 <i>Tissue Engineering</i> – Ein Überblick.....	3
2.2 Die orale Mukosa als Grundlage von Gewebeäquivalenten im <i>Tissue Engineering</i>	6
2.3 <i>In vitro</i> generierte, komplexe Weichgewebe-Äquivalente.....	8
2.4 Gefäßentwicklung und die Rolle endothelialer Progenitorzellen.....	10
2.4.1 Vaskulogenese.....	11
2.4.2 Angiogenese.....	12
2.5 Endotheliale Progenitorzellen in der Prävaskularisierung.....	14
2.6 Prävaskularisierung von 3D-Konstrukten.....	16
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Chemikalien.....	19
3.1.2 Gebrauchsmaterialien.....	21
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.4 Geräte.....	23
3.1.5 Antikörper.....	25
3.1.6 Lösungen.....	26
3.1.7 Zusätze in Zellkulturmedien.....	26
3.1.8 Zellkulturmedien.....	27
3.1.9 Primärzellen.....	28
3.1.10 Computerprogramme.....	28
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Steriles Arbeiten.....	28
3.2.2 Zellkultur.....	29
3.2.2.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen.....	29
3.2.2.2 Medienwechsel und Passagieren der Zellen.....	29
3.2.2.3 Kryokonservierung.....	30
3.2.2.4 Auftauen und Kultivieren von Zellen.....	30

3.2.3 Isolation von Primärzellen	31
3.2.3.1 Fibroblastenisolation aus humaner Mundschleimhaut	31
3.2.3.2 Isolation von ECFC aus peripher-venösem Blut	32
3.2.4 Endothelzellphänotypisierung.....	33
3.2.5 Erstellen einer Ko-Kultur auf einer Kollagenmatrix	34
3.2.6 CD31-Immunfluoreszenzfärbung.....	34
3.2.7 Chorioallantoismembran-Modell (CAM-Modell).....	35
3.2.7.1 Bestückung der CAM mit vorkultivierten <i>Bio-Gide</i> [®] -Membranen	35
3.2.8 Histologische und immunhistochemische Färbungen des explantierten Präparates.....	37
3.2.8.1 Fixierung der Weichgewebe-Äquivalente und Herstellung von Paraffinschnitten	37
3.2.8.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.....	38
3.2.8.3 HE-Färbung	40
3.2.9 Mikroskopische Aufnahmen	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1 Isolation endothelialer Progenitorzellen	41
4.2 Phänotypisierung der endothelialen Primärkulturen.....	42
4.3 Nachweis prävasculärer Strukturen innerhalb der Kollagenmatrix (<i>Bio-Gide</i> [®] - Membran).....	43
4.4 Entwicklung der besiedelten Membranen innerhalb des CAM-Modells	45
4.5 Angiogenese bei Inkubation im CAM-Modell	47
4.6 Intravasale Erythrozyten und aviäre Gefäßstrukturen	52
5. Diskussion	54
5.1 ECFC aus Vollblutisolation und deren Phänotypisierung.....	54
5.2 Eignung von ECFC für die Gefäßbildung in 3D-Kollagenmembranen	56
5.3 Degradation der <i>Bio-Gide</i> [®] -Membran	58
5.4 Beurteilung der Integration prävascularisierter Weichgewebe-Äquivalente nach <i>in vivo</i> -Kultivierung.....	59
5.5 Methodendiskussion – <i>in ovo</i> CAM-Modell	62
6. Ausblick	65
7. Zusammenfassung	66
8. Literaturverzeichnis.....	68
9. Tabellarischer Lebenslauf.....	83
10. Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantoismembran
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (engl. day)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECFC	<i>Endothelial colony forming cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
et al.	und andere (lat. et alia)
EZM	Extrazellulärmatrix
FAD	Medium aus DMEM/F-12 1:1
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung
HDMEC	<i>Human dermal microvascular endothelial cells</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

MSH	Mundschleimhaut
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
h	Stunde
TE	<i>Tissue Engineering</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vWF	von-Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundlagen des <i>Tissue Engineerings</i> , modifiziert nach (37).....	5
Abbildung 2: Mikroskopischer Querschnitt durch unverhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel der Mundhöhle.....	8
Abbildung 3: Schematischer Überblick der Vorgänge während der embryonalen und adulten Vaskulogenese, modifiziert nach (76).....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Intussuszeption, modifiziert nach (80).	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der sprossenden Angiogenese,.....	14
Abbildung 6: Zellphasen vor und nach Zentrifugation.....	33
Abbildung 7: Präparationsphasen des CAM-Modells	37
Abbildung 8: EPC-Genese nach Isolation.....	41
Abbildung 9: Morphologisch veränderte ECFC nach <i>in vitro</i> -Kultivierung	42
Abbildung 10: Ausschnitte der ECFC-Charakterisierung.....	43
Abbildung 11: Verteilung der ECFC auf der <i>Bio-Gide</i> [®] -Membran.....	44
Abbildung 12: Nachweis mikrovaskulärer Strukturen innerhalb von über 14 Tagen kulturell kultivierten <i>Bio-Gide</i> [®] -Membranen	45
Abbildung 13: Besiedelte Membranen im <i>in ovo</i> CAM-Modell.....	46
Abbildung 14: Grenzbereich zwischen den Gewebeäquivalenten bzw. der Kontrolle und der CAM	47
Abbildung 15: Endothelialer Monolayer nach <i>in vivo</i> CAM-Modell.....	49
Abbildung 16: Anschnitte mikrovaskulärer Strukturen nach Inkubation der besiedelten Membran im <i>in vivo</i> CAM-Modell.....	51
Abbildung 17: Mikrovaskuläre Strukturen nach fünf Tagen Besiedlungsdauer <i>in vivo</i>	52
Abbildung 18: HE-gefärbte Präparate zum Nachweis von Erythrozyten.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien	19
Tabelle 2: Eingesetzte Gebrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 4: Eingesetzte Geräte	23
Tabelle 5: Eingesetzte Primärantikörper mit Angabe der Spezies und Verdünnung für Immunfluoreszenz (IF)- oder Immunhistochemie (IHC)-Färbungen	25
Tabelle 6: Eingesetzte Lösungen	26
Tabelle 7: Eingesetzte Zusätze in Zellkulturmedien	26
Tabelle 8: Eingesetzte Primärzellen	28
Tabelle 9: Eingesetzte Software	28
Tabelle 10: Volumina (Zellkulturmedium, Trypsin-, Gelatinelösung) für Zellkulturflaschen.....	30
Tabelle 11: Aufsteigende Alkoholreihe des Tissue-Tek®-Einbettautomaten	38
Tabelle 12: Absteigende alkoholische Reihe	39
Tabelle 13: Aufsteigende alkoholische Reihe	40

1. Einleitung/Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel in der regenerativen Medizin ist stets, die vollständige Funktionalität und Morphologie zuvor beeinträchtigter Gewebe oder Organe wiederherzustellen (1). Hierfür existieren innerhalb der Geweberekonstruktion vielfältige Lösungsansätze, von denen die Herstellung spendereigener (autologer) Präparate durch Techniken des *Tissue Engineerings* einen abbildet.

In der Gynäkologie sind bei vielen angeborenen oder erworbenen Krankheitsbildern Schleimhäute betroffen. Häufig existieren hierfür keine zufriedenstellenden Behandlungsoptionen (2). Zur Deckung von Schleimhautdefekten wurden anfangs Spalthaut oder autologe, orale Transplantate verwendet (2, 3, 171). Hierbei wurden schnell Limitationen festgestellt: Einerseits ist vor allem bei jungen Patienten, aber auch bei ausgedehnten Defekten, die Verfügbarkeit geeigneten, autologen Materials eingeschränkt, andererseits ist die Haut nicht als gleichwertiger Ersatz für Schleimhautdefekte zu verwenden (4). Aufgrund des unterschiedlichen Milieus mazeriert die Hornschicht der Haut nach Implantation, eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen ist die Folge (5). Weitere Schwierigkeiten entstehen durch die vorhandenen Hautanhangsgebilde, wie Haare oder Drüsen (6).

Einen patientenzentrierten Lösungsansatz können heutzutage durch *Tissue engineering* generierte Weichgewebe-Äquivalente liefern. Ihr Einsatz erfolgt bereits in zahlreichen medizinischen Fachdisziplinen (2, 7, 8, 9, 10). Eine Biopsie geringen Umfangs liefert ausreichend autologes Zellmaterial, um ein patientenindividuelles Transplantat mit Hilfe einer Gerüststruktur (*Scaffold*) zu erzeugen. Eine immunologische Reaktion durch die Implantation des *Scaffolds*, hergestellt auf Basis einer xenogenen, zellfreien Matrix, bleibt durch vorherige laborchemische Verfahren nahezu aus.

Eine weitere Hürde, welche es zu überwinden gilt, stellt die Vaskularisation dar (11). Die Diffusionsstrecke für Nährstoffe und Sauerstoff ist zu kurz für mehrschichtige 3D-Äquivalente. Eine Lösungsmöglichkeit stellen Techniken zur Prävaskularisierung dar. Durch die Prävaskularisierung soll *in vitro* ein feines, gut verzweigtes, mikrovaskuläres Netz im Konstrukt geschaffen werden. Idealerweise erfolgt eine Anbindung der spendereigenen Gefäßstrukturen an dieses innerhalb weniger Tage. Die Nekrose- und

Abstoßungsrate werden verringert und ein erfolgreiches Einwachsen der Präparate kann gewährleistet werden (12).

Für die erfolgreiche Versorgung von Patienten mit Gewebeäquivalenten sind somit eine möglichst patientenindividuelle Herstellung und ein erfolgreiches Einwachsen unabdingbar. Letzteres ist wiederum abhängig von einer ausreichenden Blutversorgung des Gewebeäquivalentes innerhalb möglichst kurzer Zeit. Zentral ist zudem, *in vitro* generierte Laborergebnisse an die klinische Praxis zu adaptieren. Hierfür sind als unmittelbare Schnittstelle *in vivo*-Testungen essentiell.

Um sich diesem Ziel zu nähern, wurden in der vorliegenden Arbeit in allen Versuchen endotheliale, koloniebildende Zellen (ECFC, engl. *endothelial colony forming cells*), statt der bisher verwendeten Endothelzellen aus der männlichen Vorhaut (HDMEC, engl. *human dermal microvascular endothelial cells*), eingesetzt. Vorteilhaft ist die vergleichsweise aufwandsarme Gewinnung von ECFC aus einer autologen Blutprobe eines jeden Patienten. In einem ersten Schritt musste eine zuverlässige Isolation und Kultivierung der ECFC gewährleistet werden. Zur Phänotypisierung der Isolate erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern der Oberflächenmarker CD14, CD31 und CD133. Im weiteren Verlauf wurde, durch Ko-Kultivierung mit Fibroblasten der Mundschleimhaut (MSH-Fibroblasten) auf einer Kollagenmatrix (Geistlich *Bio-Gide*®), die Bildung mikrovaskulärer Strukturen innerhalb der Matrix zu verschiedenen Versuchszeitpunkten untersucht. Hierfür wurden endothelzellspezifische Immunfluoreszenzfärbungen von CD31 angewendet.

Weiterhin beruhen bisherige Erkenntnisse weitestgehend auf *in vitro*-Versuchen, weshalb in dieser Arbeit breitere *in vivo*-Studien erfolgen sollten. Es wurden abschließend mehrere *in vivo*-Versuchsreihen verschiedener ECFC-Spender mit über drei Stunden und 14 Tagen ko-kultivierten Weichgewebe-Äquivalenten durchgeführt. Als Modell wurde das *in ovo* Chorioallantoismembran-Assay (CAM-Assay) gewählt. Der Untersuchungszeitraum im Modell erstreckte sich über die embryonalen Entwicklungstage fünf bis neun. Die Präparateproben wurden anschließend immunhistochemisch und histologisch gefärbt, um eine vaskuläre Anbindung des Weichgewebe-Äquivalentes an das bestehende Gefäßsystem der CAM zu beurteilen.

2. Literaturdiskussion

2.1 *Tissue Engineering* – Ein Überblick

Tissue Engineering (*TE*) ist ein interdisziplinärer Bereich der regenerativen Medizin. Den größten Anwendungsbereich findet man in der Onkologie, zudem auch in Bereichen der kardiovaskulären, muskuloskelettalen und neurodegenerativen Medizin, sowie in der Immunologie und bei der Behandlung von hereditären Erkrankungen (13). Mittels *TE* generierte, artifizielle Gewebe werden genutzt, um Gewebedefekte zu heilen, genetische Fehlbildungen zu rekonstruieren oder geschädigte Organe teilweise oder vollständig zu ersetzen (14). Gewinnbringend können diese Techniken u.a. zur Reduktion von Komplikationen durch Primär- und Sekundäreingriffe, sowie bei einem Mangel an autologem Gewebe eingesetzt werden (15). Bereits 1993 beschrieben Langer et al. drei grundlegende Herangehensweisen des *TE*: 1. Zellisolation und Zellkultur, 2. die Verwendung von Signalmolekülen, wie z.B. Wachstumsfaktoren und 3. eine direkte Verbindung der Zellen mit einer Matrix vor der Implantation (1) (Abb.1).

Die ersten avaskulären Gewebe konnten schon vor etwa 50 Jahren erfolgreich in Tiermodellen angewandt werden (16). Schließlich gelang es Green et al. 1979 ein *in vitro*-Epithelkonstrukt, das sogenannte Epicel[®], aus spendereigenen Keratinozyten zu erzeugen (17). Dieses konnte später als Epidermiserersatz *in vivo* verpflanzt werden (17). So konnten relativ zügig auch andere Gewebe aus einer Zellart generiert und teilweise verpflanzt werden (18). In einem nächsten Schritt stand die Erzeugung eines komplexeren, mehrschichtigen Gewebeäquivalentes (*full-thickness tissue*) durch die Kombination verschiedener Zellarten im Mittelpunkt. Mit Apligraf[®] wurde das erste zweischichtige, *full-thickness* Hautäquivalent erstellt (19). Zur Herstellung wurden Fibroblasten in einer Kollagenmatrix zusammen mit Keratinozyten verwendet, wodurch ein Konstrukt aufgebaut aus einer Dermis und Epidermis erzeugt werden konnte (19). Während das *TE* vor der Jahrtausendwende schnelle Fortschritte erzielen konnte, stagnierte die Forschung aus wirtschaftlichen Gründen in den nachfolgenden Jahren (20).

Erst ab 2005 entstand ein erneuter Aufschwung, welcher bis heute anhält. Ein neuer Fokus lag nun auf der Herstellung funktional-komplexer Organe und Gewebe, wie der

Harnblase, Trachea oder Niere (21, 22, 23). Heutzutage werden vor allem die Stammzellbiologie und 3D-Techniken, sowie die Schnittstelle zwischen lebenden Zellen *in vitro* und *in vivo* näher erforscht, um patientenspezifische, funktionale Äquivalente ohne umfassende chirurgische Intervention zu generieren (24, 25). Besondere Herausforderungen liegen noch immer in der Herstellung von komplexen Geweben, wie z.B. Schleimhäuten, in der Abstoßung von Fremdmaterial, der Narbenentstehung, sowie Nekrotisierung und in der Angiogenese (26).

Die Methodenvielfalt innerhalb des *TE* ist groß. Biologische Gewebeäquivalente können *in vitro* aus autologem oder allogenen Zellmaterial generiert werden; weiterhin können dezellularisierte Gerüste, xenogene Materialien oder als neue Entwicklung der letzten Jahre Bioprinting zum Einsatz kommen (27). Die Herangehensweise ist in den Grundlagen ähnlich: Eine Biopsie aus gesundem Gewebe eines Patienten liefert Zellmaterial, welches *in vitro* kultiviert und vervielfältigt wird (Abb.1). Weit verbreitet ist der Einsatz einer porösen, formgebenden Matrix zur Herstellung von Gewebeäquivalenten, welche dann als Gerüststruktur (*Scaffold*) bezeichnet wird. Die Matrix kann aus biologischen Polymeren auf Protein- bzw. Polysaccharidbasis, oder synthetischen Polymeren hergestellt werden (20, 28, 29, 30). Der *Scaffold* ist für die Neubildung von dreidimensionalem Gewebe essentiell. Er substituiert die physiologische Extrazellulärmatrix (EZM) und steuert die Proliferation, die Ausdifferenzierung und die Biosynthese der Zellen, wobei er zugleich das Einwachsen gewebefremder Zellen verhindert (31, 32). Ferner lässt sich durch Signalmoleküle das Zellverhalten durch die unmittelbare Einflussnahme auf die Zellproliferation, -migration und -differenzierung steuern (170). Das artifizielle Ersatzgewebe kann schließlich in den Patienten implantiert oder für *in vivo*-Testungen eingesetzt werden. Nach einer Implantation *in vivo* wird der *Scaffold* idealerweise vollständig resorbiert.

2. Literaturdiskussion

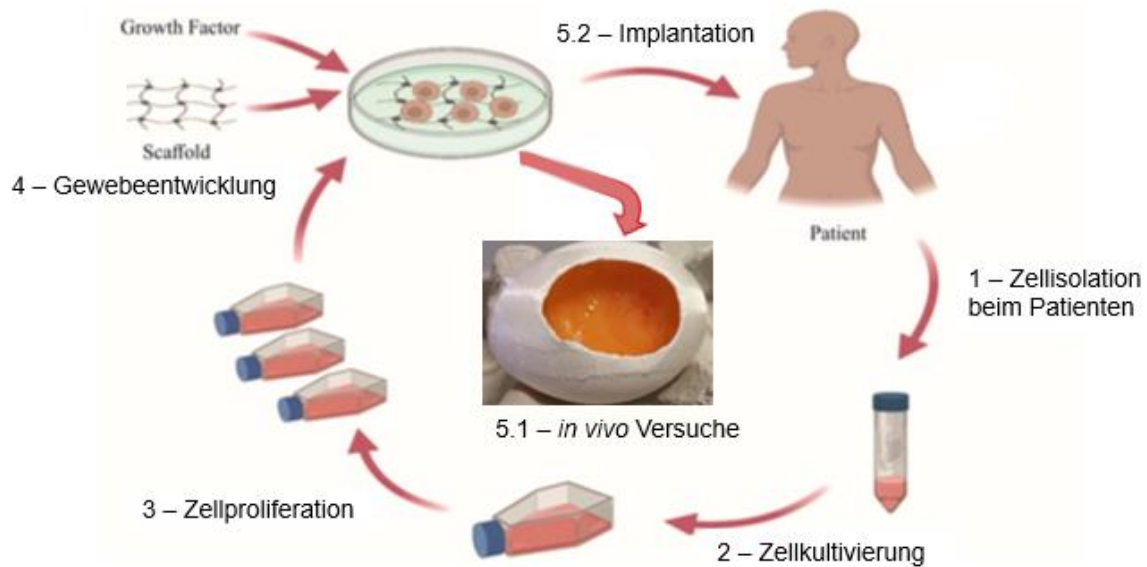


Abbildung 1: Grundlagen des *Tissue Engineerings*, modifiziert nach (37).

Bei der Auswahl des Materials sollte deshalb auf die bestmögliche Biokompatibilität und -stabilität, auf die Erfüllung der mechanischen Ansprüche sowie die Porengröße und Porosität des Materials geachtet werden (33). Porosität und Porengröße sind wichtige Parameter der hergestellten Gewebeäquivalente für die Versorgung mit Nährstoffen, die Vaskularisation, den Abtransport von Stoffwechselendprodukten, das Zellwachstum und die Zellmigration (34). Hier existieren je nach Zelltyp und Zellfunktion große Unterschiede. So ergibt sich für Fibroblasten eine ideale Porengröße von 100 – 250 μm , für die erfolgreiche Angiogenese bzw. Vaskularisation hingegen 30 μm bis über 300 μm (31, 35, 34). Grundsätzlich wären also größere Poren im Bereich von 100 – 250 μm als vorteilhaft für die Zellfunktion und Gefäßbildung anzusehen. Limitiert wird dies jedoch durch eine reduzierte Stabilität des *Scaffolds*. Ein stabiler *Scaffold* wiederum ist wichtig, um den bereits genannten Anforderungen eines temporären Platzhalters während der Gewebeentwicklung gerecht zu werden (32).

Das *TE* findet in der Gynäkologie ein immer breiteres Anwendungsspektrum. Ein zuverlässiger Einsatz erfolgt bereits in der Urogynäkologie, aber auch bei Erkrankungen des Beckenbodens, vaginalen Pathologien und zum Ersatz von Follikeln des Ovars werden Gewebeäquivalente erprobt (2, 36, 37). Das in der vorliegenden Arbeit generierte Weichgewebeäquivalent knüpft an dieser Stelle an und begegnet dem Mangel an geeignetem autologen Gewebe. Eine künftige Anwendung

nach Tumorexizionen, bei urethralen Fehlbildungen oder nach Traumata ist denkbar, jedoch ist hierfür eine ausreichende vaskuläre Versorgung des Weichgewebeäquivalentes unabdingbar (38).

2.2 Die orale Mukosa als Grundlage von Gewebeäquivalenten im *Tissue Engineering*

Schleimhäute sind mehrschichtige oder mehrreihige, Hohlorgan oder Oberflächen auskleidende Gewebe. Vertreten sind sie vor allem im Mund-Nasen-Rachenbereich, im Gastrointestinaltrakt, im Auge und dem Urogenitaltrakt. An der jeweiligen Lokalisation dient vor allem die Epithelschicht durch das Vorhandensein dichter Interzellularkontakte (*tight junctions*, Adhäsionskontakte, *gap junctions*) als Schutzbarriere (39).

Hautäquivalente zeigen morphologisch größere Gemeinsamkeiten mit oraler Mukosa als mit Schleimhäuten in anderen Körperregionen, weshalb viele der bestehenden wissenschaftlichen Erkenntnisse des *TE* auf die Schleimhaut übertragen werden konnten (40, 41). Eine ähnliche Histologie der auskleidenden Mundschleimhaut macht Einsätze bei urethrogenitalen oder ophthalmologischen Rekonstruktionen, sowie bei der Versorgung von Brandwunden möglich und gilt bei vielen Behandlungen aktuell als Goldstandard (42). Im Vergleich zu anderen Geweben besitzt vor allem die unverhornte Mundschleimhaut eine hohe Selbstheilungstendenz durch rasche Zellproliferation bei gleichzeitig geringer Narbenbildung und Kontraktion (43, 44, 45). Außerdem zeichnet sie eine hohe Belastbarkeit durch die beim Sprechen, Kauen und Schlucken entstehenden Scherkräfte aus (46).

Von der Funktionalität beeinflusst, lassen sich verschiedene Arten oraler Mukosa unterscheiden: die auskleidende Mundschleimhaut, die mastikatorische Mundschleimhaut und die spezialisierte Mundschleimhaut (47). Den größten Anteil mit etwa 60% hat die auskleidende Mundschleimhaut, welche aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel besteht (40). Sie findet sich im Mundvorhof, am Mundboden, an den Alveolarfortsätzen, der Zungenunterseite und am weichen Gaumen. Die mastikatorische Mundschleimhaut findet sich entlang des harten Gaumens und der Gingiva. Aufgrund der starken mechanischen Beanspruchung in dieser Region stellt sie sich histologisch keratinisiert oder parakeratinisiert dar. Am

2. Literaturdiskussion

Zungengrund findet sich die spezialisierte Mukosa. Diese ist mit verschiedenen Papillen besetzt, welche der Geschmackswahrnehmung und dem lingualen Tastsinn dienen. Da das in der vorliegenden Arbeit generierte Weichgewebeäquivalent ubiquitär eingesetzt werden soll, beziehen sich sämtliche Ausführungen auf nicht keratinisiertes Gewebe.

Die Mukosa besteht aus zwei, nur im Gastrointestinaltrakt aus drei Schichten – Lamina epithelialis mucosae, Lamina propria mucosae und im Gastrointestinaltrakt zusätzlich der Lamina muscularis mucosae (48). Die Lamina epithelialis wird noch einmal in drei Schichten unterteilt: Stratum basale, Stratum filamentosum, auch bezeichnet als Stratum intermedium, und Stratum distendum, oder auch Stratum superficiale genannt (Abb. 2). Ihre Dicke beträgt je nach Lokalisation zwischen 0,1 mm und 0,5 mm (49). Nach kaudal wird die Schicht durch eine Basalmembran begrenzt. Charakteristisch ist ein hoher Zellumsatz, sowie ein dichter Zellverband als Voraussetzung für die Funktion als Schutzschicht vor systemisch und lokal wirkenden physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Umwelteinflüssen (40, 50).

Die sich anschließende Lamina propria mucosae stellt eine dichte Bindegewebsschicht dar. Sie besitzt einen hohen Anteil an elastischen Fasern vom Kollagen-Typ I, III, V und VI und wird in ein Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilt (46). Über das Stratum papillare wird die Gaumenschleimhaut und Gingiva mit dem Periost und den Muskelfasziern verbunden und die Lamina epithelialis mit Nährstoffen versorgt (51). Eine Unterscheidung zwischen Stratum papillare und Stratum reticulare ist über den mikroskopischen Aufbau möglich. Während im Stratum papillare die Kollagenfasern locker angeordnet sind, findet sich im Stratum reticulare ein dichtes Netz nahezu parallel angeordneter Fasern (45). Die Lamina propria dient als Verschiebeschicht und gewährleistet eine hohe Mobilität der darüberliegenden Schleimhaut, wie z.B. beim Kauen oder Schlucken (52). Die prädominierende Zellart sind Fibroblasten. Als weitere Strukturen lassen sich Nervenendigungen, Blutgefäße und in den tieferen Bereichen auch Speicheldrüsen finden (33).

Als unterste Schicht ist die Submukosa definiert. Die Submukosa besteht aus Bindegewebe und beinhaltet hauptsächlich Fettgewebe und Drüsenzellen (5). Das lockere Gewebe setzt sich ähnlich wie die Lamina propria aus kollagenen und

elastischen Fasern zusammen. Funktional ist sie ebenfalls an der Beweglichkeit bzw. Verschieblichkeit der darüberliegenden Schichten beteiligt.

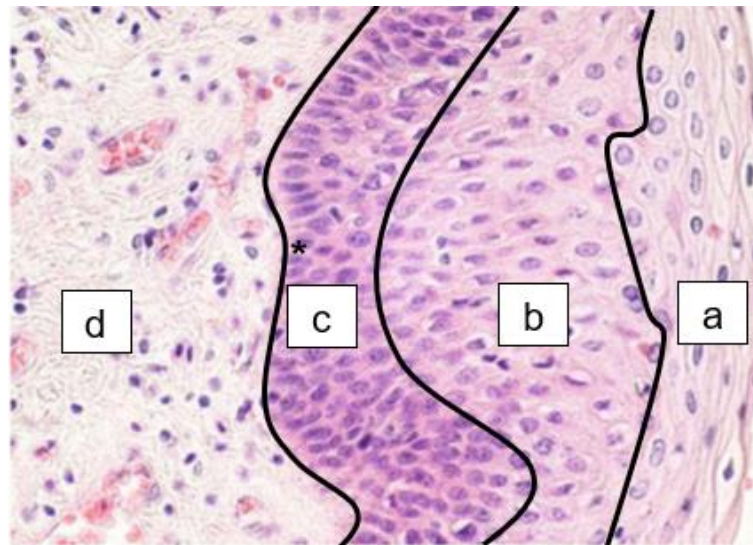


Abbildung 2: Mikroskopischer Querschnitt durch unverhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel der Mundhöhle.

Durchgängige, schwarze Linien begrenzen grob den Verlauf der Zellschichten. a: Stratum superficiale (Stratum distensum), b: Stratum intermedium (Stratum filamentosum), c: Stratum basale, d: Lamina propria. Das (*) kennzeichnet den gedachten Verlauf der Basalmembran. Modifiziert nach (53).

Als Grundlage plastischer Rekonstruktionen werden aktuell als kurativer Ansatz häufig patienteneigene Gewebepräparate u.a. aus Schleimhäuten verwendet. Als nachteilig anzusehen sind hier vor allem die zusätzliche Morbidität durch den Eingriff, das mit der Intervention verbundene Komplikationsrisiko und die Krankheitsdauer, die limitierte Gewebemenge sowie die veränderte Funktionsfähigkeit des Gewebes abhängig vom Entnahmeort (33, 54, 55). Für artifizielle Schleimhäute werden im Rahmen des *TE* zwar ebenfalls autologe Biopsien benötigt, diese sind jedoch deutlich kleiner als bei regulären Gewebeentnahmen. Durch *in vitro* generierte Gewebeäquivalente, welche *in vivo* verpflanzt werden, reduziert sich die benötigte Gewebemenge zusätzlich. Anfangs genannte Fallstricke können hierdurch teilweise umgangen werden.

2.3 *In vitro* generierte, komplexe Weichgewebe-Äquivalente

Grundsätzlich finden sich aktuell bei der Herstellung von Gewebeäquivalenten zwei Konzepte. Zum einen können im Rahmen des traditionellen *top-down*-Ansatzes azelluläre Matrices, welche die gewebeeigene Regenerationsfähigkeit des

Organismus voraussetzen, verwendet werden (56). Die Zellen werden hierbei auf einen in der Größe und Architektur vordefinierten *Scaffold* gesät. Zum anderen besteht beim *bottom-up*-Ansatz die Möglichkeit, verschiedene Module, z.B. *cell sheets* oder gedruckte Zellen, zur Anwendung zu bringen (56). In diesem Fall werden die Zellen durch Zuhilfenahme von chemischen und physikalischen Stimulantien angeregt, sich in gefäßartigen Strukturen zu organisieren. So können funktionelle Einheiten *in vitro* gebildet werden, welche sich baukastenartig bis hin zu komplexen Geweben oder Organen zusammenfügen lassen (25, 56).

Die Grundlage eines Gewebeäquivalentes wird durch eine künstliche Extrazellulärmatrix (EZM) gelegt. Die natürliche EZM umgibt geflechtartig die Zellzwischenräume. Sie besteht aus verschiedenen, formgebenden Fasertypen (elastisch, kollagen und retikulär), sowie einer losen, amorphen Grundsubstanz (57). Die Hauptbestandteile der Grundsubstanz sind Proteoglykankomplexe, Glykoproteine, Kollagene und Glucosaminoglykane (58). Grundsätzlich sollte bei der Wahl des *Scaffolds* eine Ähnlichkeit zur natürlichen Interzellulärschicht bestehen, um die Proliferation, Adhäsion und Differenzierung der ausgesäten Zellen zu unterstützen (42). Die künstliche Matrix dient unter anderem der Zelladhäsion, fördert Zell-Zell-Interaktionen und reguliert die Widerstandsfähigkeit des artifiziellen Gewebes (59, 60). Weitere relevante Faktoren für die Auswahl sind eine gute biologische Abbaubarkeit und eine geringe Immunantwort durch den Empfänger (41).

In dieser Arbeit diente ein azelluläres, deproteinisiertes 3D-Kollagenkonstrukt (Geistlich *Bio-Gide*®), aufgebaut aus porcinem Kollagen-Typ-I und Typ-III, als Gerüst (61). Durch die Verwendung azellulären Materials sollen bei gleichzeitig guter Regeneration des Gewebes *Host-versus-Graft*-Reaktionen vermindert werden (62). Die Membran besteht jeweils aus einer zelloklusiven und einer porösen Seite. Die Porengröße der okklusiven Seite beträgt ca. 4 – 8 µm, die der porösen Seite 44 – 171 µm (63). Humane Fibroblasten messen etwa 50 – 100 µm und werden auf der porösen Seite ausgesiedelt, um eine Migration in die Matrix zu ermöglichen (64). Dort sind sie für die Ausbildung einer Extrazellulärmatrix verantwortlich. Außerdem bestimmen sie maßgeblich die Proliferation und Differenzierung der endothelialen Progenitorzellen durch die Sekretion proangiogener Faktoren (33).

Vorherige Projekte der Arbeitsgruppe zeigten, dass prävascularisierte Konstrukte aus Epithelzellen, Fibroblasten der Mundschleimhaut und humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Präputiums in einer Bi- oder Trikultur auf einer Kollagenmembran *in vitro* gebildet werden konnten (44). Die hier verwendete polymere Membran aus organischem Kollagen begünstigt den raschen zellulären Umbau *in vivo*, die Vaskularisation und Funktionalität des neuen Zellverbandes. Organisches Kollagen besitzt nur eine geringe Immunogenität, unter anderem aufgrund einer komplexen Behandlung zur Dezellularisierung und einem anschließenden mehrstufigen Sterilisationsprozess, so dass eine Immunreaktion nach der Implantation zumeist ausbleibt (173). Beide Faktoren bedingen schließlich ein erfolgreiches Einwachsen im Empfänger. In weiteren Versuchen konnte im Mausmodell bei über 21 Tage *in vitro* vorkultivierten Weichgewebe-Äquivalenten ein Anschluss der kapillarähnlichen Strukturen an ein bestehendes Gefäßsystem nach 5 Tagen histologisch nachgewiesen werden (65).

Als problematisch stellt sich jedoch die begrenzte Verfügbarkeit der Endothelzellen und die Beschränkung auf das männliche Geschlecht dar. Eine mögliche Alternative stellen aus peripher-venöser Punktion gewonnene endotheliale, koloniebildende Zellen (ECFC) dar. ECFC stellen eine Subgruppe endothelialer Progenitorzellen dar, deren Alleinstellungsmerkmal die *de novo*-Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen ist (103). Die erfolgreiche Vaskularisation von mehrschichtigen, großflächigen Gewebeäquivalenten ist wiederum der entscheidende Aspekt für die klinische Anwendbarkeit, vor allem um das frühe Überleben des Transplantates zu sichern (11, 38, 69).

2.4 Gefäßentwicklung und die Rolle endothelialer Progenitorzellen

Gefäßnetzwerke finden sich ubiquitär im Organismus. Ihre gemeinsame Aufgabe ist die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen durch Gasaustausch, der Transport von Stoffwechselprodukten, Signalmolekülen und Wärme (66). Morphologisch zu unterscheiden sind Arterien, Venen und Kapillaren. Ihnen gemein ist ein auf die physiologischen Anforderungen angepasster, dreischichtiger Wandaufbau bestehend aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia (66). Im Gegensatz zu Arterien und Venen weisen Kapillaren keine separate Muskelschicht auf. Kapillaren sind als die kleinste Gefäßeinheit klassifiziert, bilden insgesamt jedoch die größte Fläche im

Gefäßsystem aus (66). Ihre durchlässige, blutseitige Endothelzellschicht und die feine Verzweigung ermöglichen die Versorgung des umgebenden Gewebes mit Nährstoffen.

Die größtmögliche Strecke, welche mittels Diffusion überwunden werden kann, beträgt ca. 0,1 – 0,2 mm (67). Bei der Implantation von Gewebeäquivalenten ist Diffusion allein, aufgrund der Dicke der Äquivalente, somit nicht ausreichend. Ohne eine suffiziente Gefäßeinsprossung fehlt jegliche Zufuhr von Sauerstoff (Hypoxie) und Nährstoffen. Ferner können Stoffwechselendprodukte nicht abtransportiert werden. Die durch die Hypoxie bedingte Ischämie kann in der Folge zu einem teilweisen oder vollständigen Absterben des Substituts führen (68). Ischämien begünstigen wiederum das Auftreten von Gewebenekrosen und Infektionen. Aufgrund dessen versuchte man zunächst, die Gefäßentwicklung lokal durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Scaffolds zu induzieren (68). Mittlerweile ist die Etablierung von prävascularisierten Konstrukten via *Tissue Engineering* ein vielversprechender Lösungsansatz. Hierbei spielen die Vaskulogenese und Angiogenese als Möglichkeiten der Gefäßentstehung zusammen.

2.4.1 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Entstehung von Gefäßen *de novo* sowohl in der Embryogenese, als auch im adulten Organismus. Während der frühen Embryonalperiode entstehen Blutinseln im Seitenplattenmesoderm aus Hämangioblasten (11) (Abb. 3). Die zentral gelegenen Zellen reifen zu hämatopoetischen Stammzellen heran. Aus den peripheren Hämangioblasten entstehen Vorläuferzellen, welche man Angioblasten nennt (70). Diese differenzieren abhängig von pro-angiogenen Faktoren zu Endothelzellen, welche sich schließlich zusammenlagern und ein primitives vaskuläres System ausbilden (70). Im Rahmen der im nächsten Kapitel erläuterten Angiogenese, erfolgt das Wachstum und die Verzweigung des primären Systems. Die Prozesse der Vaskulogenese und Angiogenese können daher nicht separat betrachtet werden.

Im Erwachsenenalter ist die Entstehung neuer Gefäße, die postnatale Vaskulogenese, zumeist mit pathologischen Prozessen, bspw. während der Tumorgenese, bei Hypoxie oder Inflammation, assoziiert (71, 72). Einzig im Zuge des weiblichen

2. Literaturdiskussion

Reproduktionszyklus und während der Wundheilung ist die Bildung neuer Gefäße physiologisch. Die postnatale Vaskulogenese erfolgt durch das Rekrutieren endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder unmittelbar durch das Vorhandensein jener im peripheren Blut (73) (Abb. 3). Dort beträgt der Anteil von ECFC etwa 0,05 – 0,105 Zellen/ml Blut (74). Über die genaue Funktionsweise und Herkunft der verschiedenen Zelllinien der EPC im adulten Organismus herrscht bis heute noch keine vollständige Klarheit. Sie ist daher Gegenstand aktueller Forschungen (75).



Abbildung 3: Schematischer Überblick der Vorgänge während der embryonalen und adulten Vaskulogenese, modifiziert nach (76).

2.4.2 Angiogenese

Im Gegensatz zur Vaskulogenese ist für die Angiogenese ein bereits bestehendes Gefäßnetzwerk entscheidend. Hierbei sind zwei grundsätzliche Vorgänge zu unterscheiden: Intussuszeption (Abb. 4) und Sprossung (Abb. 5). Bei der Intussuszeption (nicht-sprossende Angiogenese) kommt es durch die transvaskuläre Ausbildung von Säulen bestehend aus EZM zu einer Längsteilung einer bestehenden Kapillare in zwei Teile (77). Die Sprossung beschreibt hingegen die Migration und Proliferation von Endothelzellen nach erfolgter Proteolyse der EZM (78). Insgesamt ist der Bedarf an sich teilenden Endothelzellen beim intussuszeptiven Wachstum geringer, weshalb dieser Prozess gegenüber der Sprossung als effektiver gilt (79).

Intussuszeption

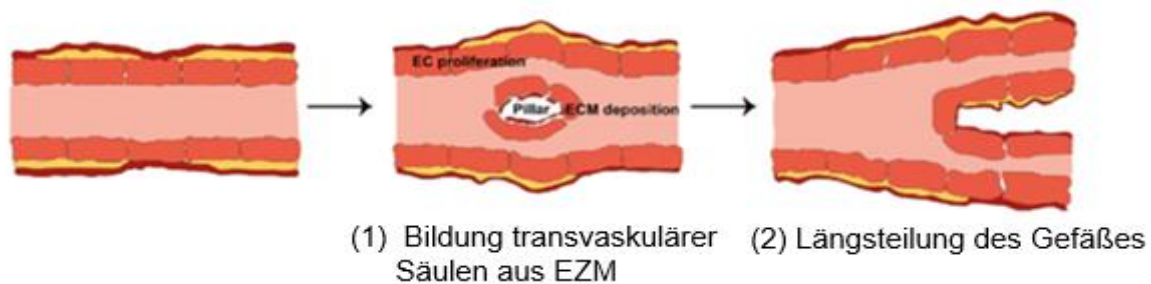


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Intussuszeption, modifiziert nach (80).

Den stärksten Anstoß für das Wachstum und die Verzweigung von Gefäßen liefern hypoxische Bedingungen, sobald die Gewebeversorgung durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist (Abb. 5). Es kommt zur Ausschüttung von Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) (81). Diese bedingen wiederum die Genregulation und führen zur Sekretion von pro- und antiangiogenen Signalmolekülen (82).

Hierbei kommt es u.a. zu einer verstärkten Produktion des Wachstumsfaktors VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*), welcher auch in der frühen Phase der Embryogenese ausgeschüttet wird (55). Die Signifikanz von VEGF-A für die Vaskularisierung zeigt sich in murinen *knock-out*-Studien. Mäuse ohne den Liganden zeigten hier keine Überlebensfähigkeit oder hochgradige Defizite in der Morphologie des Kreislaufsystems (83). Die Ausbildung vollständig funktionaler Gefäße durch VEGF-A allein ist jedoch nicht möglich. Auch andere proangiogene Faktoren der VEGF- und Ang(=Angiopoetin)-Familien, TGF (*transforming growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), Neuropilin, Notch-Proteine, Zytokine, Chemokine, sowie organspezifische Moleküle beeinflussen die Ausbildung von neuen Gefäßsträngen durch Endothelzellen (38, 84, 85).

Während der Angiogenese erhöht sich, angetrieben durch die bereits genannten Signalmoleküle, zunächst die Gefäßpermeabilität und vorhandene Interzellularbindungen werden durch Matrix-Metalloproteasen gelöst (79). Die Proliferation und Migration endothelialer Zellen in Richtung avaskulärer Gewebe setzt ein. Die führende Endothelzelle, eine sogenannte *tip cell*, bestimmt die Richtung des Gefäßwachstums. Die Differenzierung zu einer *tip cell* ist abhängig von der Expression von VEGF2-Rezeptoren, sowie dem Dll4 (*delta-like ligand 4*)/Notch Signalweg (86). Der

Differenzierungsvorgang ist als dynamisch anzusehen (87). Umgebende *stalk cells* beeinflussen durch Proliferation die Gefäßlänge und formen das neue Lumen. Treffen zwei benachbarte *tip cells* zusammen, so verschmelzen beide Anteile. Es entstehen zunächst kapillarähnliche Strukturen. Diese können anschließend im Rahmen der Arteriogenese und abhängig von Scherkräften morphologische Veränderungen durchlaufen und sich so zu Arterien differenzieren (88).

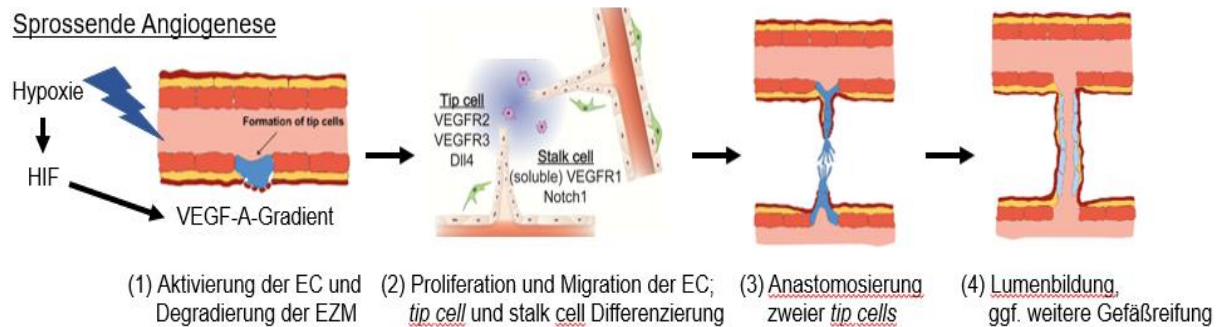


Abbildung 5: Schematische Darstellung der sprossenden Angiogenese, modifiziert und zusammengefügt nach (80) und (89).

2.5 Endotheliale Progenitorzellen in der Prävasikularisierung

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) bilden eine heterogene Gruppe mononukleärer Zellen ab. Sie stammen von multipotenten Stammzellen ab und besitzen die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung. Im Blut zirkulierende, endotheliale Progenitorzellen wurden vor 25 Jahren erstbeschrieben (99). Weiterführende Forschungen konnten ihnen vielfältige Aufgaben (Biomarker, Regeneration) bei von ischämischem Gewebe betroffenen Krankheitsbildern und der Vaskularisierung nachweisen (100, 101). Unklarheit herrscht noch immer über die exakte Funktionsweise der Mobilisation, ihre Aktivität, die Interaktion mit anderen Zellpopulationen und die Charakterisierung (102).

Unterschieden werden eine hämatopoetische und eine endotheliale Zellreihe. Unter den hämatopoetischen Zellen werden myeloische, angiogene Zellen (MAC), oder auch *early outgrowth endothelial cells* subsumiert (103). Diese Zelllinie stimuliert die Angiogenese durch parakrine Ausschüttung proangiogener Faktoren (104). Die Zellen selbst können jedoch nicht zu reifen Endothelzellen differenzieren. Ihnen fehlt somit auch die Fähigkeit zur Ausbildung tubulärer Strukturen (105). Immunphänotypisch werden sie gekennzeichnet durch einen positiven Nachweis für CD14, CD31, CD45;

negativ verhalten sie sich für CD133 und CD146 (106). In der Zellkultur ist ihr Auswachsen zwischen dem dritten und fünften Tag beschrieben (105).

Die endotheliale Zellreihe umfasst *late outgrowth endothelial cells*, welche in Kultur auch als ECFC bezeichnet werden (103). ECFC lassen sich aus verschiedenen Kompartimenten des Körpers isolieren. Am häufigsten erfolgt die Isolation aus dem Knochenmark, aus Nabelschnurblut Neugeborener oder aus peripher-venösem Blut. Bis vor einigen Jahren wurde postuliert, ECFC würden ausschließlich aus dem Knochenmark freigesetzt werden. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass ECFC auch aus spezifischen Geweben isoliert werden können (100, 102). Somit wird aktuell mehrheitlich die These vertreten, dass ECFC auf intrinsische Signale hin direkt aus der Gefäßwand freigesetzt werden können (107, 108). Dies deutet auf ein neues Verständnis bezogen auf die Herkunft hin.

Trotz der bestehenden Unklarheiten die Zelllinie betreffend, wurde in den vergangenen Jahren versucht, eine einheitliche Definition zu erstellen. So müssen ECFC [1] zweifelsfrei den Endothelzellen zugeordnet werden können, [2] ein stabiles Proliferationspotenzial aufweisen und [3] sich *in vivo* zu funktionalen Blutgefäßen zusammenfinden (103). Letztgenannter Punkt der *de novo*-Tubulogenese und -Angiogenese unterscheidet ECFC eindeutig von der myeloischen Zellreihe. Dies bedeutet auch, dass ECFC sich positiv für endotheliale Marker, wie z.B. CD31, CD34 und von Willebrand Faktor (vWF) zeigen, aber negativ für monozytäre Marker wie CD14 oder CD45 (71, 102).

Für die vorliegende Arbeit bedeutsam ist die Funktion der endothelialen Progenitorzellen in Bezug auf die Vaskularisierung von bioartifiziellem Gewebe. Um die Jahrtausendwende rückten zunächst reife Endothelzellen in den wissenschaftlichen Fokus. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass durch Endothelzellen präformierte Mikrogefäßstrukturen Anschluss an ein bestehendes Gefäßsystem erlangen können (109). Mit der Entdeckung und den wachsenden Erkenntnissen über endotheliale Progenitorzellen fanden diese bevorzugt Anwendung. Im Vergleich zu reifen Endothelzellen führen sie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit zu einer Immunreaktion, sie können mittels einer einfachen Blutentnahme als autologe Zellen gewonnen werden und besitzen als Vorläuferzellen ein hohes Proliferationspotenzial (110). In frühen Versuchen konnten die zu reifen

Endothelzellen äquivalenten bzw. zum Teil überlegenen tubulogenen Eigenschaften, sowie die erfolgreiche Integration von prävascularisierten Hautäquivalenten im murinen Modell nachgewiesen werden (111, 112). Aufgrund der vorteilhaften pro-angiogenen Zell-Zell-Interaktion finden häufig Ko-Kulturen mit Fibroblasten oder mesenchymalen Stammzellen Anwendung (113, 114, 115).

2.6 Prävascularisierung von 3D-Konstrukten

Wie bereits erwähnt, hängt die erfolgreiche Transplantation der Präparate maßgeblich von einer suffizienten Oxygenierung ab. Implantiert man ein *in vitro* generiertes Gewebekonstrukt ohne bereits ausgebildete mikrovaskuläre Strukturen, so beginnt die spontane Neovaskularisierung im Rahmen der Wundheilung automatisch. Nachteilig ist vor allem die Zeitspanne bis zur Entstehung erster Mikrogefäße. Diese wachsen mit ungefähr 5 µm/h vergleichsweise langsam (90). Die Ausbildung eines Gefäßnetzes von der Empfängerseite aus würde mehrere Wochen in Anspruch nehmen, was zu einem Absterben der Zellen im Zentrum mehrschichtiger Gewebeäquivalente führen kann (90, 91). In vergleichenden Untersuchungen mit Kollagenmembranen im *in vivo*-Tiermodell konnte eine Vaskularisierung innerhalb von *Bio-Gide*[®]-Membranen nach zwei Wochen dokumentiert werden (172). Die Bereitstellung von Äquivalenten mit einem bestehenden, kapillarähnlichen Netzwerk begegnet dieser Problematik. Der Untergang von Gewebe vor allem in den zentralen Bereichen soll so minimiert und die Anbindung an ein bestehendes Gefäßsystem erleichtert werden (44). Die Anbindung eines *in vitro* generierten Mikrogefäßsystems an die Gefäße des Empfängers wird als Inoskulation bezeichnet (92).

Eine grundsätzliche Unterteilung der Methoden der Prävascularisierung kann in *in vitro*- und *in vivo*-Techniken erfolgen. Zwei weit verbreitete *in vitro*-Methoden sind die *cell seeding*- und die *cell sheet*-Technik. *Cell sheets* bestehen aus einschichtigen Zellverbänden, welche auf einer temperierten Kulturoberfläche ausgesät werden. Die Endothelzellen bilden hier spontan ein Gefäßnetzwerk aus. Bei Bedarf können mehrere Monolayer für einen partiellen Gewebeersatz geschichtet werden (93). Beim *cell seeding* hingegen werden Endothelzellen auf einen *Scaffold* aufgebracht. Dieser bietet eine dreidimensionale Oberfläche, auf der die Zellen proliferieren und vaskuläre Strukturen ausbilden. Der *Scaffold* kann mit Biomolekülen, z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, versetzt werden, welche die Neovaskularisierung durch

Endothelzellen zusätzlich fördern (94). Zumeist wird eine Bi-/Tri-Kultur mit Fibroblasten und/oder Epithelzellen angestrebt, da diese die Vaskularisierung positiv beeinflussen (55, 65). Durch die Prävasikularisierung wird eine bessere Voraussetzung für eine schnelle Anastomosierung *in vivo* geschaffen (44).

Aktuelle Forschungen zu neuen Methoden der *in vitro*-Prävasikularisierung beziehen sich vor allem auf den Bereich Mikrodesign. Im Rahmen von 3D-Bioprinting oder Mikrofluidtechniken werden präformierte, gefäßähnliche Mikrokanäle erzeugt, welche endothelialisiert werden (95). Dies umgeht den zuvor genannten ersten Schritt der Selbstorganisation der Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen. Ein signifikanter Nachteil besteht jedoch darin, dass eine Ausbildung feiner, eng gegliederter Gefäßbetten aus dieser Methode heraus nicht möglich ist und die eingesetzten Materialien von den Zellen kaum zu durchdringen sind (96).

Die *in vivo*-Prävasikularisierung beschreibt stets invasive Methoden, welche mit multiplen Operationen verbunden sind. So kann ein Scaffold operativ in gut durchblutetes, gesundes Gewebe, wie z.B. eine Faszien- oder Muskeltasche eingebracht werden (97). Bei einer anderen *in vivo*-Methode wird ein arteriovenöser (AV) Shunt erzeugt, welcher anschließend in einen Scaffold eingelegt wird und diesen vaskularisieren soll (98). Nach einigen Wochen wird die prävasikularisierte Matrix jeweils explantiert und im defekten Gewebe mikrochirurgisch angebunden.

Ein zusätzlicher operativer Eingriff vor der eigentlichen Implantation ist bei der *in vitro*-Prävasikularisierung hingegen nicht notwendig. Dies stellt einen großen Vorteil dar. Die Erforschung eines optimalen Präparates im Bereich der *in vitro*-Prävasikularisierung und dessen Anbindung im lebenden Organismus dauert weiterhin an und ist Teil dieser Forschungsarbeit.

Innerhalb der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit erstellt wurde, konnte zunächst ein prävasikularisiertes Mundschleimhautäquivalent mit reifen Endothelzellen (HDMEC – *human dermal microvascular endothelial cells*) und Fibroblasten etabliert werden (44). Die Inoskulation im *in vivo*-Tiermodell konnte hier erfolgreich nachgewiesen werden (65). Weiterführend sollen, um eine universelle Einsetzbarkeit zu gewährleisten, anstelle der reifen Endothelzellen ECFC Verwendung finden (116). Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Folge darin, ein reproduzierbares

2. Literaturdiskussion

Weichgewebe-Äquivalent unter der Verwendung von ECFC zu etablieren, und eine zuverlässige Anastomosierung *in vivo* zu bestätigen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenin	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Biocoll® Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Collagen Typ I solution, bovine	Viscofan BioEngineering, Weinheim
Dako REAL™ Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ DAB + Chromogen	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ Substrate Buffer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako Target Retrieval Solution pH 9 (10x)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM/F-12 (1:1)	Gibco/Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – high glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline	Gibco/Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

3. Material und Methoden

EBM-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium 2	Lonza Group, Basel, Schweiz
EGF (Endothelial Growth Factor)	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
EGM-2 Endothelial SingleQuots Kit	Lonza Group, Basel, Schweiz
Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell, Heidelberg
Ethanol 96 %, vergällt mit IPA, MEK und Bitrex pur	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99,8 %, vergällt mit IPA, MEK und Bitrex pur	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gelatinepulver Typ B, bovine skin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HEPES solution (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hico – Mic Mikroskopier-Einschlussmittel	Hirtz & Co., Köln
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Natriumheparin	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Roti-Histokitt II	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sterilium classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin-EDTA, 0,25 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3. Material und Methoden

Versene EDTA (0,02 %)	Lonza Group, Basel, Schweiz
Wassersoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylol	AppliChem GmbH, Darmstadt

3.1.2 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2: Eingesetzte Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Chirurgische Instrumente	Aesculap, Braun, Tuttlingen
CoolCell® LX	BioStorage Technologies GmbH, Griesheim
Dako Pen (Fettstift)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Feuchtkammer	Selbst hergestellt, Labor Mainz
Pinzette	Labotec, Wiesbaden
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet®pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Racksystem für Immunhistochemie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schere	Labotec, Wiesbaden
Tissue-Tek® Ausgießformen	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Tissue-Tek® II Entwässerungs- /Einbettkassette	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

3. Material und Methoden

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Discardit™ II Einwegspritzen 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
BD Microlance™ 3 0,8 x 40 mm	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Befruchtete Hühnereier, Leghorn	LSL Rhein-Main GmbH & Co.KG, Dieburg
Biopsy Punch 6,0 mm	GSK Consumer Healthcare, Waterford, Irland
Cellstar Cell Culture Plate (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Corning® CellBIND® 6-Well Zellkulturplatte	Corning Inc., New York, USA
Deckgläser 24 x 32 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einmalhandschuhe Nitril Sempercare	Semperit AG, Wien, Österreich
Einmalskalpelle	FEATHER Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Filtropur V50, 0,2 µm Poren, 500 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Geistlich Bio-Gide®	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
Kryoröhrchen 1,0 ml	Thermo Scientific Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Leucosep™ Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Leukosilk® S 2,5 cm x 9,2 cm	BSN medical GmbH, Hamburg
LUNA™ Cell Counting Slides	logos Biosystems, Gyeonggi-do, Südkorea
Objektträger SuperFrost® Plus	Thermo Scientific Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

3. Material und Methoden

Parafilm Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Pasteurpipetten aus Glas 150 mm, 230 mm	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Reagiergefäße 1 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Safety-Multifly® 21G	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Schülke Wipes 70 % Ethanol	Safe&Easy, Norderstedt
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
S-Monovette® 9 ml K3E 1,6 mg EDTA/ml Blut	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Tissue-Tek II Filterblock	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen
Zelletten 5x4 cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175-cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche Cell + Wachstumsoberfläche 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.4 Geräte

Tabelle 4: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
Absaughilfe VACUBOY	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Brutmaschine Modell 400 digital	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg

3. Material und Methoden

CO ₂ -Inkubator Heracell™ VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Digitales Mikroskop VHX-1000D	Keyence, Osaka, Japan
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Heraeus® HERAFreeze® HFU 586 basic Gefrierschrank -80 °C	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Heraeus® HERASAFE® Sicherheitswerksbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
HERAEUS® Megafuge® 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank 4 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillehöhe
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Lenovo® ThinkPad L560	Lenovo Deutschland GmbH, Stuttgart
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems, Gyeonggi-do, Südkorea
Mikroskop Leica DFC 450C	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Mikroskop Leica TCS SP8 MP	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop Leitz Dialux 22 EB	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
MultiGourmet Dampfgarer	Braun, Kronberg im Taunus
Schlittenmikrotom Hn40	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Thermoschüttler pro	CellMedia GmbH & CO. KG, Zeitz
Tissue Drying Oven TDO 60	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf
Tissue-Tek® TEC™ 5 Paraffin-Arbeitsplatz	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

3. Material und Methoden

Tissue-Tek® VIP® Einbettautomat	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex VF2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Wasserbad AquaLine AL18	LAUDA D. R. WOBSEER GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen
Zeiss Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Eingesetzte Primärantikörper mit Angabe der Spezies und Verdünnung für Immunfluoreszenz (IF)- oder Immunhistochemie (IHC)-Färbungen

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung (Anwendung)
Alexa Fluor 594 anti-human CD 14, Biolegend, San Diego, CA, USA	Mouse monoclonal	1:800 (IF)
Alexa Fluor™ 647 anti-human CD 31, Biolegend, San Diego, CA, USA	Mouse monoclonal	1:4000 (IF)
Alexa Fluor™ 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody, Biolegend, San Diego, CA, USA	Mouse monoclonal	1:800 (IF)
Anti-human CD31, Dako, Santa Clara, CA, USA	Mouse monoclonal	1:50 (IF, IHC)
Anti-human von-Willebrand-Faktor, Dako, Santa Clara, CA, USA	Rabbit polyklonal	1:1000 (IHC)
Anti-human CD 133 Alexa Fluor™ 488-konjugiert, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	Mouse monoclonal	1:8000 (IF)

3. Material und Methoden

F(ab') ₂ -Goat anti-Mouse IgG (H+L) CrossAdsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488-konjugiert, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Goat polyklonal	1:200 (IF)
Mouse IgG2a Isotype Control, Fluorescein, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Mouse monoklonal	1:8000 (IF)

3.1.6 Lösungen

Tabelle 6: Eingesetzte Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
70 % Ethanol	99,8 % Ethanol vergällt, verdünnt mit VE-Wasser
BSA-Lösung (Block-Lösung)	1 % BSA in DPBS
Gelatine-Lösung	2 mg/ml in DPBS
Kollagen-I-Lösung	0,05 mg/ml in DPBS

3.1.7 Zusätze in Zellkulturmedien

Tabelle 7: Eingesetzte Zusätze in Zellkulturmedien

Medienzusatz	Zusammensetzung
Adenin-Lösung	1,215 g in 50 ml 0,2 M HCl gelöst
bFGF (basic fibroblast growth factor) - Lösung	Stammlösung von 1,25 µg/ml: 25 µg/ml bFGF in TRIS-Puffer mit DPBS auf 1,25-µg/ml verdünnt
Choleratoxin	0,5 mg Choleratoxin in 595 µl H ₂ O gelöst

3. Material und Methoden

EGF (epidermal growth factor)	200 µg EGF in 20 ml H ₂ O gelöst
Hydrocortison-Lösung	1 mg Hydrocortison in 200 µl 99,8 % Ethanol und 2,3 ml H ₂ O gelöst
Natrium-Heparin-Lösung	50 mg/ml in Aqua dest. gelöst

3.1.8 Zellkulturmedien

ECFC-Kulturmedium:

500 ml EBM-2
+ EGM-2 Single Quot Kit
+ 20 % FCS

Fibroblasten-Medium:

500 ml DMEM
+ 10 % FCS
+ 1 % P/S

ECFC-Medium:

500 ml Endothelial Cell Growth Medium MV2
+ 15 % FCS
+ 1 % P/S
+ 2,5 ng/ml bFGF-Lösung
+ 10 µg/ml Na-Heparin-Lösung
+ 28 mM HEPES

FAD-Medium:

60 % DMEM
+ 30 % DMEM/F-12
+ 10 % FCS
+ 1 % P/S
+ 22 µg/ml Adenin-Lösung
+ 7,4 ng/ml Cholera toxin
+ 9 ng/ml EGF
+ 36 ng/ml Hydrocortison-Lösung
+ 5,4 µg/ml Insulin

3. Material und Methoden

Medium für Kryokonservierung: 50 ml FCS
+ 10 % DMSO

3.1.9 Primärzellen

Tabelle 8: Eingesetzte Primärzellen

Zelltyp	Isolationsgewebe
ECFC (engl. <i>endothelial colony forming cells</i>)	Peripher-venöses Vollblut (human)
Fibroblasten	Mundschleimhaut (human)

3.1.10 Computerprogramme

Tabelle 9: Eingesetzte Software

Name	Hersteller
BZ-II Viewer & Analyzer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Fiji ImageJ	open source Java image processing program
LAS V4.9	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft Power Point, Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Steriles Arbeiten

Die Zellkulturarbeit fand stets unter sterilen Kautelen statt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter der Verwendung von Nitrilhandschuhen und vorheriger Desinfektion mit Terralin liquid® unter einer Sicherheitswerkbank mit sterilem, laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad (37 °C) erwärmt. Lediglich die histologischen Färbungen fanden unter nicht-sterilen Bedingungen statt.

3. Material und Methoden

3.2.2 Zellkultur

Sämtliche im Folgenden erläuterten Experimente und Zellkultivierungen erfolgten unter Standardbedingungen (37,0 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) im Inkubator.

3.2.2.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Für die Isolation und Kultivierung von endothelialen Progenitorzellen war eine Beschichtung der Oberfläche von Zellkulturplatten und -flaschen notwendig. Hierfür wurden je nach Arbeitsschritt verschiedene Lösungen verwendet.

Zur Isolation von endothelialen Progenitorzellen aus peripher-venösem Blut wurden Wells einer 6-Well-Platte mit je 1 ml einer 50 µg/ml-haltigen Kollagen-I-Lösung beschichtet. Zum weiteren Auswachsen der endothelialen koloniebildenden Zellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC) wurden Zellkulturflaschen größenabhängig mit einer 2 mg/ml-haltigen Gelatine-Lösung beschichtet (Tab. 10). Die Inkubation der Beschichtung erfolgte bei beiden Arbeitsschritten über über Nacht unter Standardbedingungen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und einmalig mit DPBS gespült, bevor eine Besiedlung erfolgte.

3.2.2.2 Medienwechsel und Passagieren der Zellen

Zum Medienwechsel wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Es folgte das zweimalige Waschen mit DPBS. Abschließend wurde ein an das Kulturgefäß angepasstes Volumen frisches ECFC-Kulturmedium oder Fibroblasten-Medium hinzugegeben und weiter inkubiert (Tab. 10).

Bei etwa 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mehrmals mit DPBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurde je nach Größe der Kulturflasche und in Abhängigkeit der Zelllinie eine adäquate Menge einer Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben (Tab. 10). Die Kulturflasche wurde für 3 min inkubiert, um die optimale Enzymkinetik zu erreichen. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen optisch kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums gestoppt. Anschließend wurde die Suspension in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das zellverdauende Trypsin wurde so von den Zellen getrennt und konnte abgesaugt

3. Material und Methoden

werden. Das Zellpellet wurde in Zellmedium resuspendiert und, je nach vorheriger Zelldichte, verdünnt auf Kulturflaschen verteilt, eingefroren oder für anschließende Versuche verwendet.

Tabelle 10: Volumina (Zellkulturmedium, Trypsin-, Gelatinelösung) für Zellkulturflaschen

Zellflasche [cm ²]	Mediumvolumen [ml]	Volumen Gelatinelösung [ml]	Trypsin Fibroblasten [ml]	Trypsin 1:5 verdünnt ECFC [ml]
25	5	2,5	0,5	0,25
75	15	7,5	1,0	0,5
175	25	12,5	2,5	1,0

3.2.2.3 Kryokonservierung

Das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen erfolgte zunächst analog zu der vorab beschriebenen Methode (Kap. 3.2.2.2). Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Herstellung des Kryomediums erfolgte aus FCS mit 10 % DMSO. Auf das Zellpellet wurden 3,6 ml Kryomedium gegeben. Hiermit wurden die Zellen resuspendiert. Je 1,8 ml der Zellsuspension wurden auf zwei Kryoröhrchen pipettiert und zum Frieren in einen *CoolCell*[®]-LX gegeben. Es folgte die Kühlung bei -80 °C. Zur langfristigen Lagerung wurden die Röhrchen am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2.4 Auftauen und Kultivieren von Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen für 2-5 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Für Fibroblastenkulturen wurden 5 ml Fibroblasten-Medium, für Endothelzellkulturen 2 ml ECFC-Kulturmedium in serologische Pipetten aufgezogen. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Zellsuspension mit der Pipette wurden beide Lösungen in Mischung gebracht. Eine mit Gelatine beschichtete 25 cm² Kulturflasche wurde mit der Endothelzellsuspension und weiteren 3 ml ECFC-Kulturmedium, eine 75 cm² Kulturflasche wurde mit der Fibroblastensuspension und weiteren 10 ml Fibroblasten-Medium bestückt. Es folgte die Inkubation für zunächst 24

3. Material und Methoden

h bis zum ersten Medienwechsel. Danach wurden die Kulturen unter Standardbedingungen weiter bis zur Konfluenz inkubiert.

3.2.3 Isolation von Primärzellen

Die Isolation von Primärzellen erfolgte anonymisiert und durch die Genehmigung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Antragsnummer: 2021-15794_1). Zudem wurde für die Isolation der endothelialen, koloniebildenden Zellen (ECFC) von jedem Spender vorab eine Einverständniserklärung unterzeichnet.

3.2.3.1 Fibroblastenisolation aus humaner Mundschleimhaut

Die Gewebestücke der Mundschleimhaut wurden aus Überschussmaterial der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt und in Zellmedium transportiert. Die Desinfektion der Proben erfolgte zwei Mal für 15-20 Sekunden in 70 % Ethanol. Danach wurde DPBS zugegeben und die Stücke in eine Zellkulturschale überführt. Das Bindegewebe wurde von der Epithelschicht getrennt und in ca. 1 mm² große Stücke geschnitten. Das Epithel konnte verworfen werden. Sechs bis acht Gewebestücke wurden mit der glatten Schnittfläche nach unten und ohne Medium in je ein Well einer Corning-CellBIND®-Zellkulturplatte gesetzt. Die Zuschnitte trockneten für etwa 15-20 min im Well. Daraufhin wurden 1,5 ml FAD-Medium je Well vorsichtig pipettiert, möglichst ohne die Gewebestücke zu lösen. Es folgten die Inkubation unter Standardbedingungen und der Medienwechsel alle drei Tage bis zum Auswachsen erster Zellen aus den Gewebestücken. Nach dem Auswachsen erster Zellen erfolgte die vollständige Umstellung auf Fibroblasten-Medium und der Medienwechsel alle zwei Tage.

Sobald eine Konfluenz von 90 % in einem Well erreicht war, wurden die Zellen mit 0,5 ml/Well 2 % Trypsin gelöst. Die Reaktion wurde mit 2 ml Fibroblasten-Medium gestoppt und die Lösung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Das Zellpellet wurde in 15 ml Fibroblasten-Medium resuspendiert, in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und weiter bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Versuche wurden MSH-Fibroblasten bis einschließlich Passage 10 verwendet.

3. Material und Methoden

3.2.3.2 Isolation von ECFC aus peripher-venösem Blut

Die Isolation der endothelialen Stammzellen erfolgte aus dem peripher venösen Blut freiwilliger Spender. In der zunächst angewandten, in der Arbeitsgruppe etablierten Methode wurde die Blutprobe 1:1 mit DPBS verdünnt und die mononukleäre Zellphase isoliert. Hierbei konnte während einer Kulturdauer von sechs Wochen mikroskopisch keine Entstehung von Primärkulturen beobachtet werden.

Als Modifikation wurde anschließend die Vollblutprobe ohne Verdünnung für die Isolation verwendet. Zunächst wurde in mehreren EDTA-Kalium-Monovetten ca. 54 ml peripher-venöses Blut von freiwilligen, erwachsenen Spendern gewonnen. Diese wiesen, soweit bekannt, keinerlei Vorerkrankungen auf. 50 ml Leucosep-Tubes wurden mit 15 ml Biocoll® Separating Solution befüllt und für 30 Sekunden zentrifugiert. Biocoll® hat eine Dichte von 1,077 g/l und wirkt bei der späteren Dichtegradientenzentrifugation als Separationsmittel. Nach der Zentrifugation befand sich das Separationsmittel unter der Polyethylenscheibe, auf welche nun 25 ml des Spenderblutes pipettiert wurden. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 754 g ohne Bremse für 30 min bei RT. Folgende Phasen konnten optisch differenziert werden: a. Blutplasma, b. Interphase aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), c. Ficoll-Paque, d. Pellet aus Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen (Abb. 6). Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die angereicherte PBMC-Fraktion in ein steriles Tube überführt und 1:1 mit DPBS verdünnt. Die Lösung wurde mit 535 g für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit 15 ml DPBS resuspendiert. Die beschriebenen Zentrifugationsschritte wurden wiederholt bis ein klarer Überstand entstand. Dieser konnte ebenfalls verworfen werden. Das Zellpellet wurde in 24 ml ECFC-Kulturmedium pro Reaktionsgefäß gelöst. In mit Kollagen-I-Lösung beschichtete 6-Well-Platten wurden 4 ml Zellsuspension pro Well gegeben und standardisiert inkubiert.

Der Medienwechsel erfolgte in der ersten Woche täglich mit einem Waschschrift mit DPBS + 3 % FCS, danach alle zwei bis drei Tage. Die Wells wurden alle zwei Tage unter dem Mikroskop auf Kolonien aus ECFC untersucht. Sobald Kolonien aus ECFC sichtbar wurden, stellte man diese schrittweise auf ECFC-Medium um. Bedeckte eine Kolonie etwa 50 % eines Wells, wurde sie mit 300 µl einer 0,25 %-igen Trypsinlösung

3. Material und Methoden

für 30 s gelöst. Die Reaktion wurde mit 1 ml ECFC-Medium gestoppt und die Zellsuspension bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die resuspendierten Zellen in einer mit Gelatine beschichteten 25 cm² Zellkulturflasche ausgesiedelt. Es folgte die weitere Kultur unter Standardbedingungen und ein Medienwechsel alle 2-3 Tage bis zur Konfluenz. Für die Versuche wurden lediglich ECFC von Passage zwei bis einschließlich fünf verwendet. Aufgetaute ECFC wurden für die Experimente nicht gebraucht.

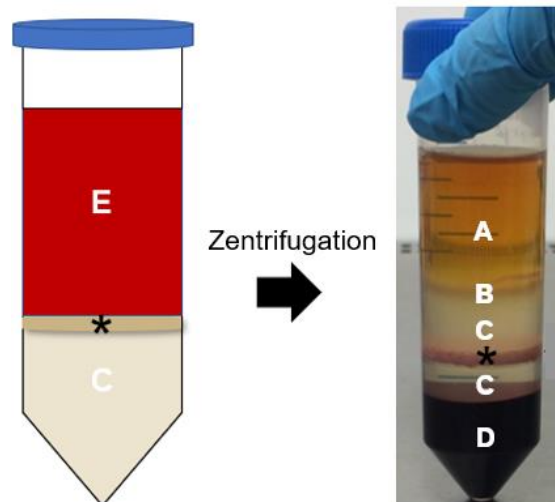


Abbildung 6: Zellphasen vor und nach Zentrifugation

Primärzellisolierung aus peripher venösem Blut. A: Blutplasma, B: mononukleäre Zellen (PBMC), C: Ficoll-Paque, D: Erythrozyten, Granulozyten, Zellreste, E: Vollblut. Das (*) kennzeichnet die Trennscheibe aus Polyethylen. Für die weitere Zellkultur wurde lediglich die PBMC-Phase verwendet.

3.2.4 Endothelzellphänotypisierung

Zur Bestimmung des Phänotypes der aus dem Vollblut isolierten Endothelzellen wurden Fluoreszenzfärbungen mit Primärantikörpern spezifisch für CD14, CD31 und CD133 sowie den entsprechenden Isotypkontrollen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 120.000 ausgewachsene ECFC/Well für sechs Tage in eine 6-Well-Platte ausgesiedelt und unter Zugabe von 1,5 ml ECFC-Kulturmedium inkubiert.

Nach dem Inkubationszeitraum wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit ROTI®-Histofix für 1 h bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen mit je 1,5 ml DPBS/Well gewaschen. Für die Färbungen wurden die Antikörper ihrer jeweiligen Verdünnung entsprechend (Tab. 5) in insgesamt 5 ml DPBS verdünnt. Pro Well wurde 1 ml der DPBS-Antikörper-Lösung pipettiert. Das gleiche Verfahren wurde für die

3. Material und Methoden

Isotypkontrolle in einem separaten Well durchgeführt. Es folgte die Inkubation für 30 min unter Standardbedingungen. Vor der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica TCS SP8 wurde die Antikörperlösung entfernt und 1 ml frisches DPBS/Well hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden mikrovaskuläre Endothelzellen der männlichen Vorhaut (*human dermal microvascular endothelial cells*, HDMEC) mitgeführt.

3.2.5 Erstellen einer Ko-Kultur auf einer Kollagenmatrix

Fibroblasten der Mundschleimhaut wurden 24 h vor den geplanten Versuchen auf ECFC-Medium umgestellt. Pro Membran werden $5,6 \times 10^4$ Fibroblasten in 200 μ l ECFC-Medium benötigt. Diese wurden analog zu dem Ablauf des Passagierens aus der Kultur gelöst. Nach dem Resuspendieren wurde die absolute Zellzahl im Zählautomat ermittelt. Die Kollagenmatrix (Geistlich *Bio-Gide*[®]) wurde als 6 mm großer Punch ausgestanzt. Die Membran beinhaltet eine zellokklusive und eine poröse Seite. Zur weiteren Bearbeitung lag die poröse Seite oben. Gekennzeichnet wurde sie durch einen Einschnitt unten links. Die Membranen wurden in einer 96-Well-Platte platziert und das adäquate Volumen der Fibroblastensuspension hierauf pipettiert. Nach einer Inkubationszeit der mit Fibroblasten bestückten Membranen von 24 h erfolgte der zweite Besiedlungsschritt. Die ECFC wurden geerntet und die Zellzahl am Zählautomaten bestimmt. Die Membranen vom Vortag wurden in ein neues Well der 96-Well-Platte überführt. Zur Besiedlung wurden pro Membran $1,12 \times 10^5$ ECFC in 200 μ l ECFC-Medium gelöst und auf die Membranen pipettiert. Abhängig vom Versuchsablauf folgte eine Inkubation der Ko-Kulturen für insgesamt 3 h oder 14 Tage. Die *Bio-Gide*[®]-Membranen der 14-tägigen Ko-Kultur wurden nach den ersten 24 h der Inkubation in eine neue 24-Well-Platte umgesetzt. Unter Zugabe von 1 ml ECFC-Medium erfolgte die weitere Inkubation unter Standardbedingungen. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

3.2.6 CD31-Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Primärantikörper CD31 erfolgte über zwei Tage. Am ersten Tag wurden die fixierten Membranen bei RT für 10 min in den Thermoschüttler bei 300 rpm gestellt und drei Mal mit 1 ml DPBS gewaschen. Zum Permeabilisieren wurde pro Membran 1 ml 0,2 % Triton[™]-X 100 zugegeben und für

3. Material und Methoden

20 min inkubiert. Es folgten drei Waschungen mit DPBS im Schüttler für je 10 min. Der Primärantikörper wurde 1:50 in DPBS mit 1 % BSA verdünnt. Je 200 µl der Lösung wurden auf die Membranen gegeben und zunächst für 2 h bei RT, anschließend bei 4 °C über Nacht auf dem Thermoschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag wurde dreimalig für je 10 min mit 1 ml DPBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler F(ab')₂-Goat-anti-Mouse-IgG-Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor™ 488 verwendet. Dieser wurde 1:200 in DPBS mit 1 % BSA verdünnt. Auf die Membranen wurden 200 µl der Lösung gegeben. Die Inkubation der Membranen erfolgte für 2 h bei RT in Dunkelheit, ebenso wie das letztmalige dreifache Waschen für je 10 min mit DPBS. Bis zur Betrachtung der Membranen unter dem Konfokalmikroskop konnten diese in 1 ml DPBS bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert werden.

3.2.7 Chorioallantoismembran-Modell (CAM-Modell)

Das CAM-Modell stellt eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der Angiogenese dar (117). Die Entwicklung eines Hühnerembryos nimmt insgesamt 21 Tage in Anspruch (118). Beginnend mit Tag drei entsteht die Chorioallantoismembran (CAM) durch eine Fusion von Anteilen der Allantois und des Chorions. Sie bildet eine gefäßdichte, extraembryonale Struktur mit der höchsten Wachstumsrate bis zum 11. Tag und mit der größten Ausdehnung am 14. Embryonaltag (119, 120). Die CAM ist an der Atmung des Hühnerembryos, am Gasaustausch, der Knochenmineralisierung und der Verwertung von Stoffwechselendprodukten beteiligt (121). Als vorteilhaft gegenüber anderen *in vivo*-Methoden hervorzuheben ist die leichte Anwendbarkeit bei gleichzeitig geringem Kosten- und administrativem Aufwand. Darüber hinaus prägt der Hühnerembryo lange Zeit kein eigenes Immunsystem aus (119). Eine Immunantwort auf die xenogenen Weichgewebeäquivalente war in diesen Versuchen daher nicht zu erwarten.

3.2.7.1 Bestückung der CAM mit vorkultivierten *Bio-Gide*®-Membranen

Die befruchteten Hühnereier Leghorn sind vom Geflügelvermehrungsbetrieb LSL Rhein-Main zur Verfügung gestellt worden. Vor dem Beginn der Versuche wurde die Eischale mit einer 70 % Ethanollösung gesäubert und auf Beschädigungen hin untersucht. Anschließend konnten die Eier in dunkler Umgebung für bis zu fünf Tage gelagert

3. Material und Methoden

werden. Zu Beginn der Versuche erfolgte die Inkubation für drei Tage in Querlage im Brutautomaten; die Oberseite wurde markiert. Die Temperatur betrug hierbei 38,5 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Am dritten Entwicklungstag wurden 8 bis 10 ml Eiklar am spitzen Eipol mit einer sterilen Kanüle in eine 5 ml Spritze aufgezogen. Hierbei war auf ein möglichst senkrechtes Einstechen in Bezug zum Ei zu achten, um den Embryo und die CAM-Strukturen zu schonen. Die Öffnung der Eierschale wurde mit Leukosilk® verschlossen. Zusätzlich wurden zwei überlappende Streifen Leukosilk® auf die Oberseite des Eis aufgebracht (Abb. 7a). Dies verhinderte das Herunterfallen von Eischale auf die CAM beim späteren Aufschneiden. Es folgte die weitere Inkubation. Am vierten Embryonaltag wurde in die Oberseite des Eis mit einer sterilen Schere ein ca. 1-2 cm großes ovales Fenster geschnitten (Abb. 7b). Am Rand der CAM, an der zur Luftkammer gegenüberliegenden Seite, wurde in die Ramifikation von kleinen Gefäßen die vorkultivierte *Bio-Gide*®-Membran platziert und leicht angedrückt (Abb. 7c). Die poröse, mit der Ko-Kultur bestückte Äquivalentseite hatte hierbei direkten Kontakt zur CAM. Das ovale Fenster wurde durch Parafilm möglichst luftdicht verschlossen und die Eier weiter inkubiert. Die Exzision der besiedelten Membranen mitsamt umliegender CAM erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Abb. 7d). Diese entsprachen den Embryonalentwicklungstagen fünf bis neun. Täglich wurden die Eier optisch auf Kontaminationen oder abgestorbene Embryonen untersucht. Betroffene Eier wurden verworfen.

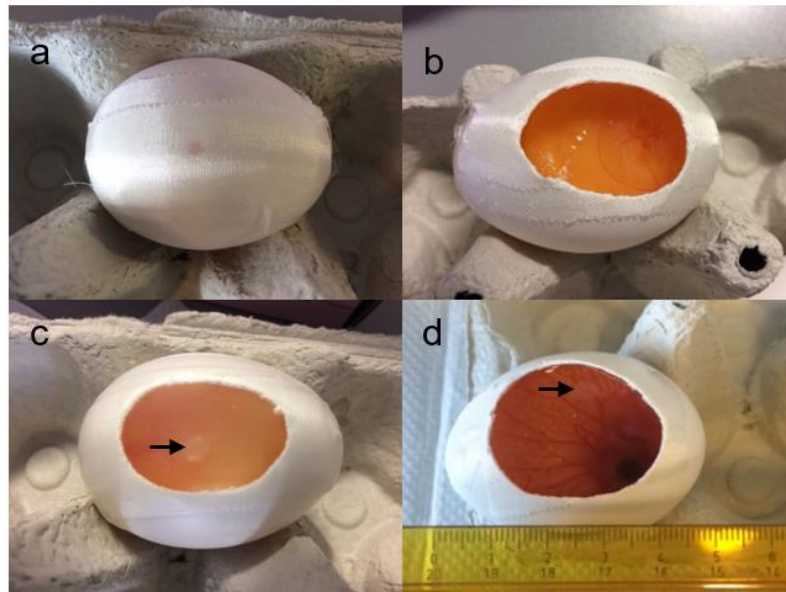


Abbildung 7: Präparationsphasen des CAM-Modells

(a) Entwicklungstag (ET) 3: Vorbereitung des Hühnereis auf die Präparation; der rote Punkt kennzeichnet die Oberseite während der Bebrütung; (b) Blick auf CAM nach erfolgter Präparation an ET 4; (c) mit Parafilm verschlossenes Blickfenster nach Platzierung der besiedelten Membran an ET 4, schwarzer Pfeil deutet auf *Bio-Gide*[®]-Membran; (d) Blick auf die CAM mit vitalem Hühnerembryo unten rechts innerhalb des Präparationsfensters, der schwarze Pfeil zeigt auf ein Weichgewebe-Äquivalent an ET 9.

3.2.8 Histologische und immunhistochemische Färbungen des explantierten Präparates

3.2.8.1 Fixierung der Weichgewebe-Äquivalente und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Präparate bestehend aus *Bio-Gide*[®]-Membran und umgebender CAM wurden vorsichtig auf *Tissue-Tek*[®]-Einbettpapier ausgebreitet und das Papier eingeschlagen. Die Präparate wurden anschließend in eine Einbettkassette gelegt und für 1 h in *ROTI*[®]Histofix fixiert. Bis zum Einbetten konnten die Gewebeproben in DPBS im Kühlraum bei 4 °C gelagert werden.

Das Einbetten in Paraffin wurde im histologischen Labor der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz am *Tissue-Tek*[®] VIP Einbettautomaten durchgeführt. In einem automatisierten Verfahren wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen (Tab. 11). Zuletzt wurden die Präparate am *Tissue-Tek*[®] TEC 5[™] Paraffin-Arbeitsplatz mit Paraffin blockartig ausgegossen.

Tabelle 11: Aufsteigende Alkoholreihe des Tissue-Tek®-Einbettautomaten

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

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte senkrecht zur porösen und okklusiven Membranseite am Schlittenmikrotom. Die Schnittstärke betrug 6 µm. Die Schnitte wurden danach direkt auf Objektträger überführt.

3.2.8.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Die Immunhistochemie dient der Detektion von Antigenen in Gewebeschnitten. Zunächst wurden die Präparateschnitte auf den Objektträgern in ein 50 °C heißes Wasserbad gesetzt und bei 60 °C für 1-2 h erhitzt. Es folgte das Überführen in ein wässriges Milieu und die Entparaffinisierung. Hierfür wurden die Objektträger in einen Glasträger eingesetzt und in einer absteigenden alkoholischen Reihe inkubiert (Tab. 12). Zur Hitzedesmaskierung wurde *Target Retrieval* pH 9 (*high* Puffer) 1:10 in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) verdünnt verwendet. Die Küvette mit den Objektträgern wurde mit der Lösung bedeckt und für 10 min in dem vorgeheizten Dampfgerat platziert. Anschließend kühlten die Objektträger in der Pufferlösung für 20-30 min auf RT ab. Die abgekühlten Präparate wurden zweimalig mit VE-Wasser gespült und in eine feuchte Kammer gelegt. Zur Begrenzung und Identifikation wurde das Präparat mit einem Fettstift umrandet. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden je 150 µl einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Stocklösung auf die Präparate aufgetragen und für 10 min in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde zweimalig mit VE-Wasser gespült und die Präparate in DPBS überführt. Um unspezifischen Antikörper-Antigen-Bindungen vorzubeugen, wurden die Schnitte mit

3. Material und Methoden

100 µl einer 1 %igen Lösung aus BSA in DPBS für 1 h bei RT in der geschlossenen Kammer inkubiert. Es folgte das zweimalige Spülen mit VE-Wasser.

Für die Immunhistologie wurden folgende Primärantikörper und Konzentrationen verwendet: CD-31 1:50 und vWF 1:1000. Je nach Größe des Präparates wurden diese mit 50 bis 100 µl der Antikörperlösung versetzt und in der feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Parallel wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, welche nur mit *Antibody Diluent* inkubiert wurde.

Tabelle 12: Absteigende alkoholische Reihe

Substanz	Zyklus	Dauer (min)
Xylol	3	10
100 % Ethanol	2	2
96 % Ethanol	2	2
70 % Ethanol	1	2
Aqua dest.	1	1

Nach dreimaligem Waschen mit DPBS für je 2 min erfolgte die Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung *Dako Real™ EnVision™* bei RT für mindestens 30 min. Die Schnitte wurden anschließend dreimalig mit DPBS für je 2 min gewaschen. Für die DAB-Färbung wurde das Reagenz stets frisch angesetzt. Die DAB-Lösung wurde hierfür 1:50 in DAB-Puffer verdünnt. Pro Objektträger wurden 100 µl der DAB-Lösung aufgetropft und für 5 min inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Aqua dest. für je 2 min. Zuletzt erfolgte die Färbung mit Mayers Hämalaun für 10 min und das anschließende Bläuen für weitere 10 min unter fließendem Leitungswasser zur Darstellung der Zellkerne. Die Objektträger wurden einmal mit VE-Wasser gespült. Es folgte die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 13) und das Eindecken der Präparate mit Mikroskopier-Einschlussmittel.

Tabelle 13: Aufsteigende alkoholische Reihe

Substanz	Zyklus	Dauer (min)
70 % Ethanol	2	2
96 % Ethanol	1	2
100 % Ethanol	2	2
Xylol	3	5

3.2.8.3 HE-Färbung

Zunächst wurden die Objektträger in eine Glasküvette eingesetzt und in einer absteigenden Alkoholreihe (Tab. 12) entparaffinisiert. Nach dem letzten Alkoholschritt wurde mit Aqua dest. gespült. Es folgte die Färbung mit Mayers Hämalaun für 10 min. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 min gebläut und einmalig mit VE-Wasser gespült. Die Färbung mit Eosin erfolgte für maximal 1 min, anschließend wurde einmalig mit Aqua dest. und 70 % Ethanol gespült. Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe (Tab. 13) zum Entwässern der Schnitte. Zum Eindeckeln der Objektträger wurde Mikroskopier-Einschlussmittel verwendet.

3.2.9 Mikroskopische Aufnahmen

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung, der histologischen Färbung und der Immunhistochemie, sowie zur Betrachtung der ko-kultivierten *Bio-Gide*[®]-Membranen auf der CAM wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Das CAM-Modell wurde digitalmikroskopisch betrachtet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden am Konfokalmikroskop, die immunhistochemischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Isolation endothelialer Progenitorzellen

Unmittelbar nach der Isolation der mononukleären Zellphase zeigte sich mikroskopisch eine große Anzahl unspezifischer Zellen. Diese stellten sich nur teilweise ädhärent dar. Nach etwa einer Woche veränderte sich die Zellmorphologie hin zu langgestreckten, spindelförmigen Zellkörpern (Abb. 8). Durch die täglichen Waschschrte war die Anzahl der Zellen im Vergleich zum Beginn der Isolation deutlich verringert. Die Erzeugung einer Primärkultur gelang schließlich bei etwa 65% (11 von 17) der Spender innerhalb von 9-25 Tagen. Zunächst war stets eine abgegrenzte Kolonie zu erkennen, aus welcher sich endotheliale Primärkulturen mit typischem kopfsteinpflasterartigem Aussehen entwickelten (Abb. 8).

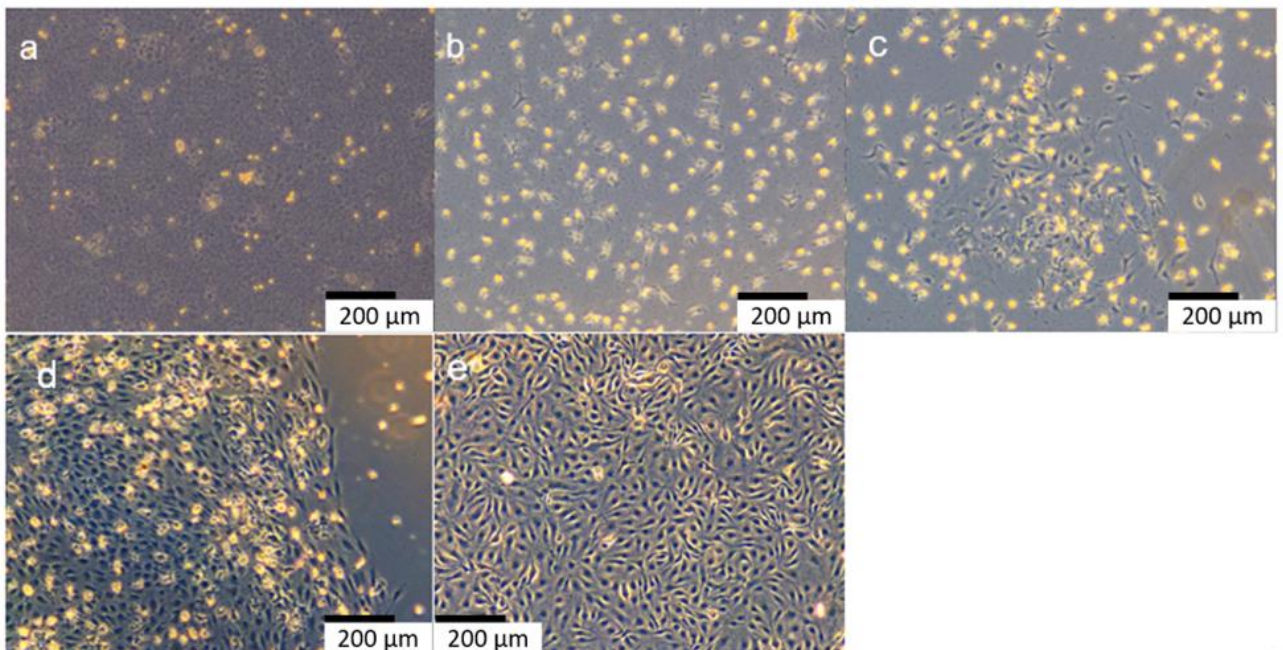


Abbildung 8: EPC-Genese nach Isolation

Die Abbildungen zeigen exemplarisch die Zellen (a) 24h nach der Isolation aus der mononukleären Zellphase; (b) eine Woche nach der Isolation mit langgestreckten, spindelförmigen Zellkörpern der *early outgrowth endothelial cells*; (c) nach etwa 10 Tagen mit abgegrenzter Kolonie bestehend aus ECFC; (d) eine Kolonie nach etwa 13 Tagen; (e) ECFC bei Konfluenz. Die Aufnahmen wurden lichtmikroskopisch mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Nicht alle der isolierten ECFC waren für anschließende Versuche geeignet. Gemäß etabliertem Protokoll wurde eine 2%-ige Trypsinlösung verwendet. Mit dieser Methode konnten die Zellen zwar erfolgreich abgelöst werden, jedoch stellten sich vermehrt

4. Ergebnisse

dysmorphe Zellen bereits in Passage eins dar und die Zellteilung stagnierte nach dem Ablösen (Abb. 9). Diese Zellen wurden verworfen und nicht für weitere Versuche benutzt. Weiterhin waren die Primärzellen in den Wells bereits wenige Sekunden nach der Zugabe des Trypsins vollständig gelöst, wodurch sich die Inkubationszeit mit der 2%-igen Trypsinlösung nicht angemessen steuern ließ.

Es folgten Ablösungsversuche mit 0,25%-igem Trypsin, Versene oder Accutase. Unter der Verwendung von Versene beziehungsweise Accutase konnten die Primärkulturen nicht aus den Wells gelöst werden. Die Verwendung der 0,25%-igen Trypsinlösung stellte sich als am zuverlässigsten in Bezug auf eine typische Zellmorphologie und ein weiteres Zellwachstum nach dem Ablösen der Primärkulturen heraus und wurde in dieser Arbeit verwendet.

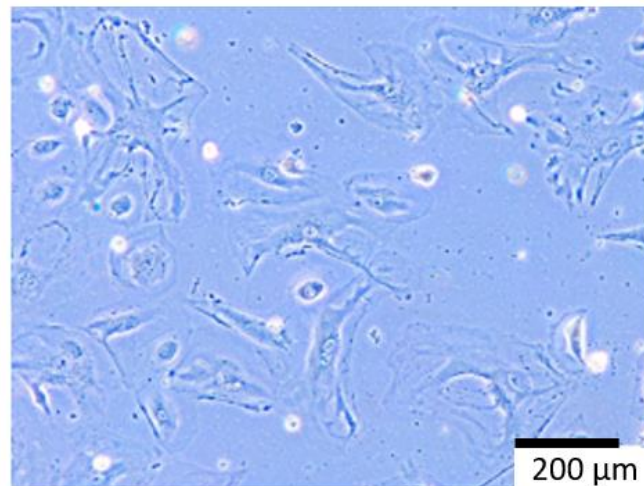


Abbildung 9: Morphologisch veränderte ECFC nach *in vitro*-Kultivierung

4.2 Phänotypisierung der endothelialen Primärkulturen

Zur Bestimmung des Phänotypes der Primärkulturen aus dem Vollblut wurde nach der Isolation exemplarisch eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. CD31 wurde als Endothelzellmarker, CD14 als Marker für Makrophagen und Monozyten und CD133 als Marker für endotheliale Progenitorzellen der hämatopoetischen Reihe verwendet. Die endothelialen, kolonieformenden Endothelzellen (ECFC) sowie als Positivkontrolle Endothelzellen aus der männlichen Vorhaut (HDMEC) wurden hierfür in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Die Primärkultur aus dem Vollblut zeigte sich unter dem Konfokalmikroskop positiv für CD31, ebenso wie die Positivkontrolle (Abb. 10). Eine

4. Ergebnisse

etwas stärkere Färbung konnte bei der Kontrolle beobachtet werden. Die Färbungen für CD14 und CD133 zeigten sich negativ.

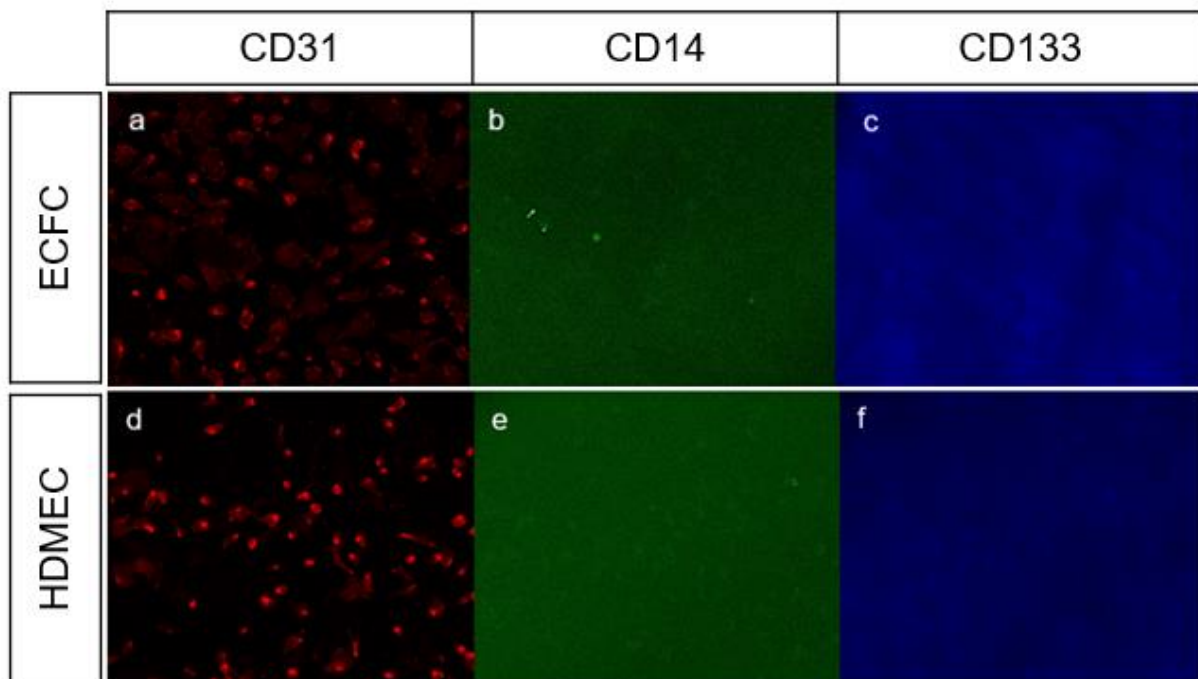


Abbildung 10: Ausschnitte der ECFC-Charakterisierung

Dargestellt sind Fluoreszenzfärbungen von ECFC (Abb. 10a-c) durch verschiedene Antikörper im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle (Abb. 10d-f), für welche HDMEC verwendet wurden. Die Aufnahmen erfolgten unter dem Konfokalmikroskop: a.+d.) CD31-Antikörper, Wellenlänge 638 nm, b.+e.) CD14-Antikörper, Wellenlänge 638 nm, c.+f.) CD133-Antikörper, Wellenlänge 488 nm.

4.3 Nachweis prävasculärer Strukturen innerhalb der Kollagenmatrix (*Bio-Gide*[®]-Membran)

In der Immunfluoreszenzfärbung des Oberflächenmarkers CD31 wurde die Entstehung von Gefäßstrukturen nach verschiedenen Kulturdauern auf *Bio-Gide*[®]-Membranen, welche mit einer Ko-Kultur aus MSH-Fibroblasten und ECFC besiedelt wurden, untersucht. In einem ersten Ansatz wurden die ECFC 24 h nach den MSH-Fibroblasten auf die *Bio-Gide*[®]-Membran gegeben. Die Inkubation der Ko-Kultur erfolgte für 3 h. Danach wurden die Membranen fixiert und die Endothelzellen mittels Färbungen von CD31-Antikörpern dargestellt. Eine Visualisierung der Antikörperfärbung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Betrachtung dreier Ansätze unter dem Konfokalmikroskop zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der ECFC auf der gesamten Membran (Abb. 11). Wie aufgrund

4. Ergebnisse

der kurzen Kulturdauer zu erwarten war, zeigten sich keine gefäßähnlichen Strukturen. Eine Anhäufung der endothelialen Progenitorzellen in einzelnen Bereichen der Membranen konnte nicht festgestellt werden, auch größere Besiedlungslücken auf den Membranen traten nicht auf.

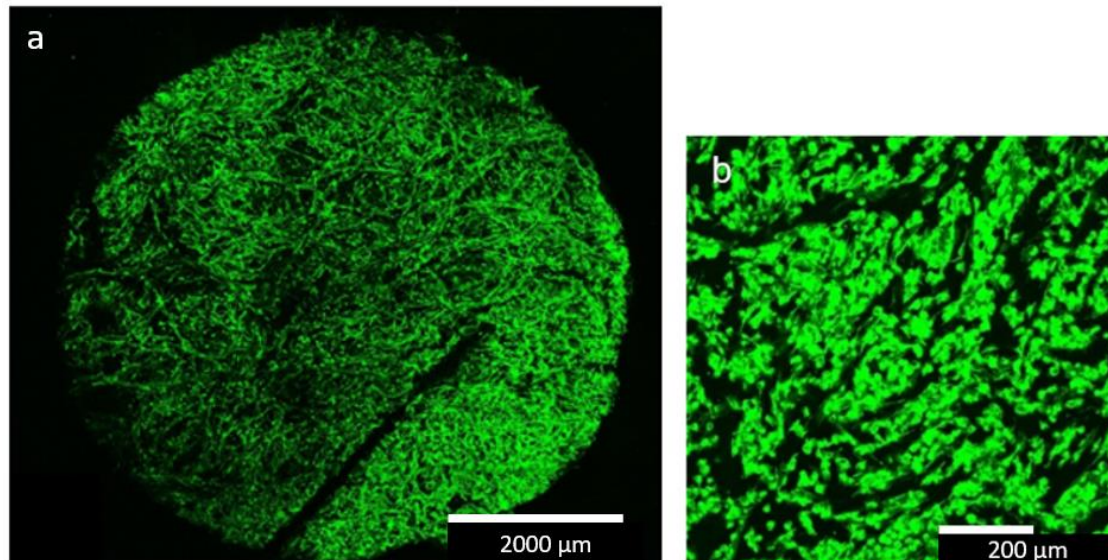


Abbildung 11: Verteilung der ECFC auf der *Bio-Gide*[®]-Membran

Dreistündige Ko-Kultur und anschließende Immunfluoreszenzfärbung von CD31. (a) Exemplarische Totalaufnahme. (b) vergrößerter Ausschnitt der Abbildung a. Der Einschnitt zur Markierung der porösen Membranfläche befindet sich in der Abbildung (a) unten rechts. Die Aufnahme erfolgte an einem Konfokalmikroskop.

Die 14-tägige Kokultur zeigte in drei Ansätzen zuverlässig und spenderunabhängig die Entstehung prävasculärer Strukturen. Diese zeigten sich glattwandig begrenzt. Eine deutlichere Ausbildung der kapillarähnlichen Strukturen erfolgte am Rand der Membran (Abb. 12) In diesem Bereich waren zahlreiche Verzweigungen und größere Durchmesser der mikrovaskulären Strukturen objektivierbar. Ebenso zeigte sich eine ringförmige Organisation, sowie eine Konfluenz der Strukturen in Richtung Zentrum der Membran. Die CD31-positiven Strukturen im Zentrum der Membran verliefen zumeist linear, erschienen weniger stark verzweigt und hatten einen geringeren Durchmesser. Einige prävasculäre Strukturen zeigten blinde Enden. In einem Versuchsdurchlauf zeigten die Endothelzellen filopodienartige Ausläufer, wie sie auch während der Angiogenese beschrieben werden. Einzelne Zellen wie im dreistündigen Versuchsdurchlauf konnten nur vereinzelt angefärbt werden. Die gemessenen Gefäßdurchmesser lagen zwischen 5 und 25 µm (Abb. 12).

4. Ergebnisse

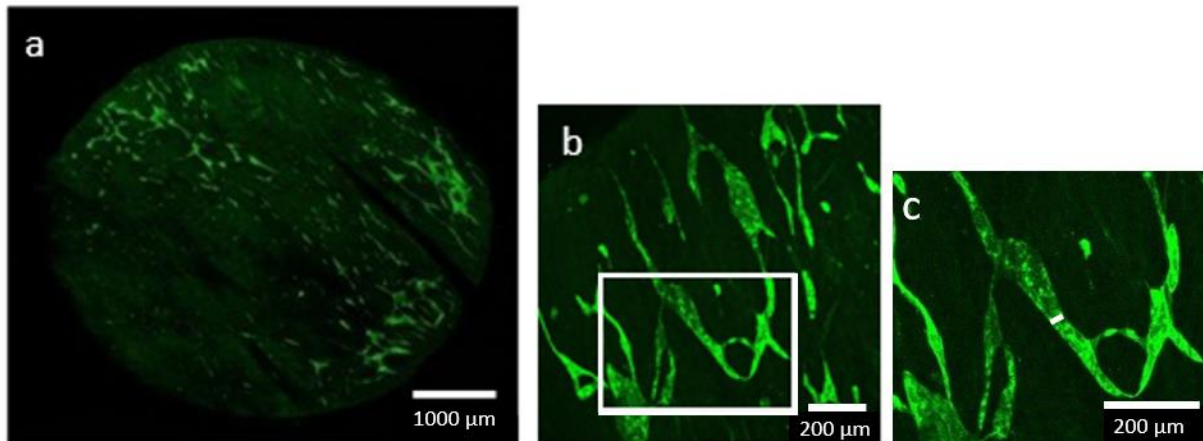


Abbildung 12: Nachweis mikrovaskulärer Strukturen innerhalb von über 14 Tagen ko-kultivierten *Bio-Gide*®-Membranen

Der Nachweis erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen des Endothelzellmarkers CD31. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Konfokalmikroskop. (a) Dargestellt ist eine exemplarische Totalaufnahme einer prävascularisierten *Bio-Gide*®-Membran. (b) Dargestellt ist ein Ausschnitt eines verzweigten, prävascularisierten Bereiches. Der Bereich innerhalb der weißen Markierung wird in Abb. 12c dargestellt. (c) Gezeigt wird ein vergrößerter Ausschnitt aus b. Der weiße Balken stellt den Durchmesser einer mikrovaskulären Struktur dar. Die Balkenlänge beträgt ca. 25 µm.

4.4 Entwicklung der besiedelten Membranen innerhalb des CAM-Modells

Nachdem die vorkultivierten *Bio-Gide*®-Membranen auf die Chorioallantoismembran (CAM) übersiedelt wurden, wurde die Entwicklung des Konstruktes *in ovo* unter dem Digitalmikroskop dokumentiert. Ziel war es, eine Integration in die CAM und einen Blutfluss innerhalb der Membran zu dokumentieren. Es wurden jeweils drei unabhängige Spender je Versuchsaufbau an den Embryonaltagen fünf bis neun (5 Besiedlungstage) untersucht. Pro Versuchstag und Spender konnten ein bis zwei Membranen dokumentiert werden.

Im CAM-Modell mit für drei Stunden ko-kultivierten Membranen zeigte sich digitalmikroskopisch keine signifikante Veränderung der Membran zwischen Besiedlungstag eins und fünf (Abb. 13). Optisch war weder eine Veränderung der Membranbeschaffenheit, noch das Vorhandensein von Erythrozyten innerhalb der Membran objektivierbar. Im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle, einer äquilibrierten, unbesiedelten Membran, stellten sich die besiedelten Membranen gleich dar. Ebenso flottierten die Membranen auch am 5. Besiedlungstag noch frei auf der CAM.

Die Weichgewebeäquivalente mit 14-tägiger Vorbesiedlung mit ECFC und MSH-Fibroblasten zeigten bei fast allen Spendern optische Veränderungen etwa ab dem

4. Ergebnisse

zweiten bis dritten Besiedlungstag (Abb. 13). Die Membran verlor ihre Opazität und erhielt ein gallertartiges Aussehen. Hierbei blieb die ursprüngliche Membrangröße gleich. Auch schien sich die Dicke der Membran nicht zu verändern. Eine Positionsänderung, abseits des regulären Wachstums der CAM, konnte im Vergleich zur dreistündigen Kokultur nicht dokumentiert werden. Die vorkultivierte *Bio-Gide*[®]-Membran schien bereits ab dem ersten Besiedlungstag mit der Chorioallantoismembran verbunden zu sein. Bei der Kontrollmembran konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden.

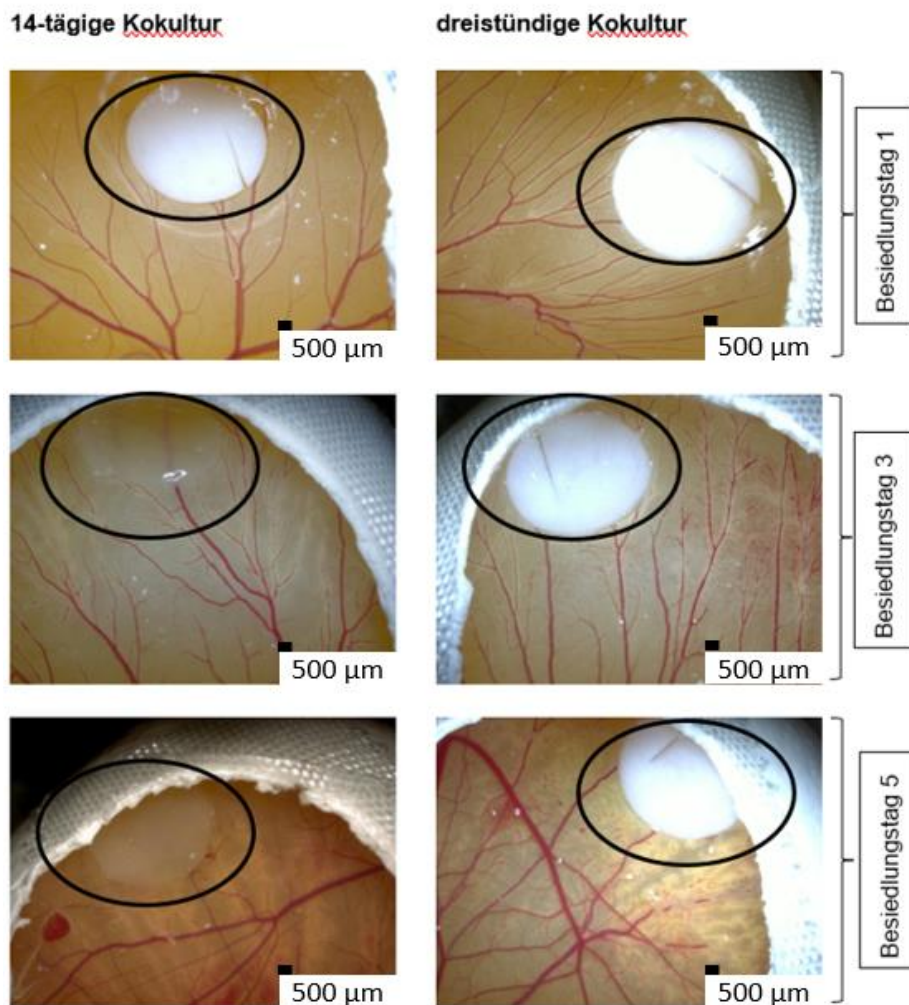


Abbildung 13: Besiedelte Membranen im *in ovo* CAM-Modell.

Dargestellt sind *Bio-Gide*[®]-Membranen auf der CAM an den Besiedlungstagen 1, 3 und 5. Die linke Spalte zeigt die Membranen der dreistündigen Kokultur, rechts die Membranen nach 14-tägiger Kokultur. Eingekreist sind jeweils die *Bio-Gide*[®]-Membranen. Die zelloklusive Seite zeigt in den Aufnahmen jeweils nach oben. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung unter dem Digitalmikroskop.

4. Ergebnisse

Zur Untersuchung der vaskulären Integration erfolgten Aufnahmen in 150-facher und 200-facher Vergrößerung im Randbereich der besiedelten Membranen (Abb. 14). Die Darstellung der Gefäße im Grenzbereich zeigte keinerlei Unterschiede zur mitgeführten Kontrolle. Die Gefäßdichte und die Gefäßverzweigungen stellten sich optisch gleich dar. Es konnte keine verstärkte Vaskularisierung oder ein Einwachsen bzw. Überwachsen der Membran durch die CAM dokumentiert werden. Um die Angiogenese genauer untersuchen zu können, wurden histologische Präparate angefertigt.

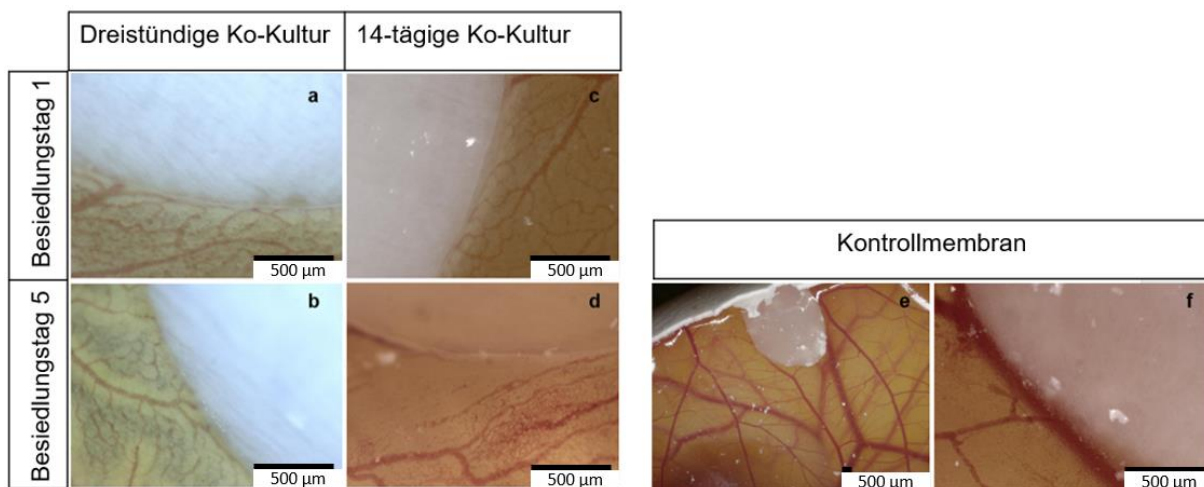


Abbildung 14: Grenzbereich zwischen den Gewebeäquivalenten bzw. der Kontrolle und der CAM

Im Vergleich sind vorkultivierte *Bio-Gide*[®]-Membranen der Besiedlungstage eins (obere Bildreihe) und fünf (untere Bildreihe) im CAM-Modell dargestellt. (a, b) Gezeigt werden über drei Stunden ko-kultivierte Äquivalente. (c, d) Gezeigt sind über 14 Tage ko-kultivierte Äquivalente. (e, f) Eine äquilibrierte Kontrollmembran wurde ebenfalls nach fünf Besiedlungstagen betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten unter dem Digitalmikroskop in 200-facher und 150-facher Vergrößerung.

4.5 Angiogenese bei Inkubation im CAM-Modell

Zur Untersuchung der Angiogenese nach der *in vivo*-Kultivierung wurden immunhistochemische und HE-Färbungen der Membranen verschiedener Versuchsdurchläufe angefertigt. Der Nachweis von Endothelzellen erfolgte durch Färbungen von CD31 und von-Willebrand-Faktor. Beide Proteine werden von Endothelzellen exprimiert. Für jeden Versuchstag wurden bei jedem Spender mindestens drei Membranen fixiert. Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten nicht an allen Membranen, sondern exemplarisch. Die Auswahl erfolgte zufällig. Es wurden Schnitte von 40 verschiedenen Membranen mit

4. Ergebnisse

zuvor erfolgter 14-tägiger Ko-Kultur und 33 verschiedene Membranen mit vorab 3-stündiger Ko-Kultivierung untersucht. Im CAM-Modell konnten für die über drei Stunden vorkultivierten Membranen drei Versuchsreihen durchgeführt werden, für die über 14 Tage vorkultivierten Membranen vier Versuchsdurchgänge.

Es erfolgten außerdem immunhistochemische Färbungen von *alpha-smooth muscle actin*, um die Reifung der Gefäße darzustellen (nicht dargestellt). Da es hierbei zu einer starken Hintergrundfärbung und zu unspezifischen Bindungen der Antikörper an aviärem Gewebe kam, konnte keine Aussage bezüglich des Gefäßstatus abgeleitet werden. Die Färbungen wurden nicht in die Betrachtungen eingebunden.

Die dreistündige Ko-Kultur zeigte in allen Versuchsdurchläufen nach der *in vivo*-Kultivierung einen schmalen Saum aus CD31-positiven Zellen auf der porösen Seite der *Bio-Gide*[®]-Membran. In der Vergrößerung war dieser am ehesten als Monolayer aus Endothelzellen zu erkennen (Abb. 15). Ein Einwandern der Zellen in die Membran konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich keine Organisation der Zellen zu vaskulären Strukturen.

In der immunhistologischen Färbung des von-Willebrand-Faktors konnten die Beobachtungen aus den immunhistochemischen Färbungen von CD31 bestätigt werden, wenngleich sich die Färbungen bei einigen Proben schwächer darstellten (Abb. 15).

4. Ergebnisse

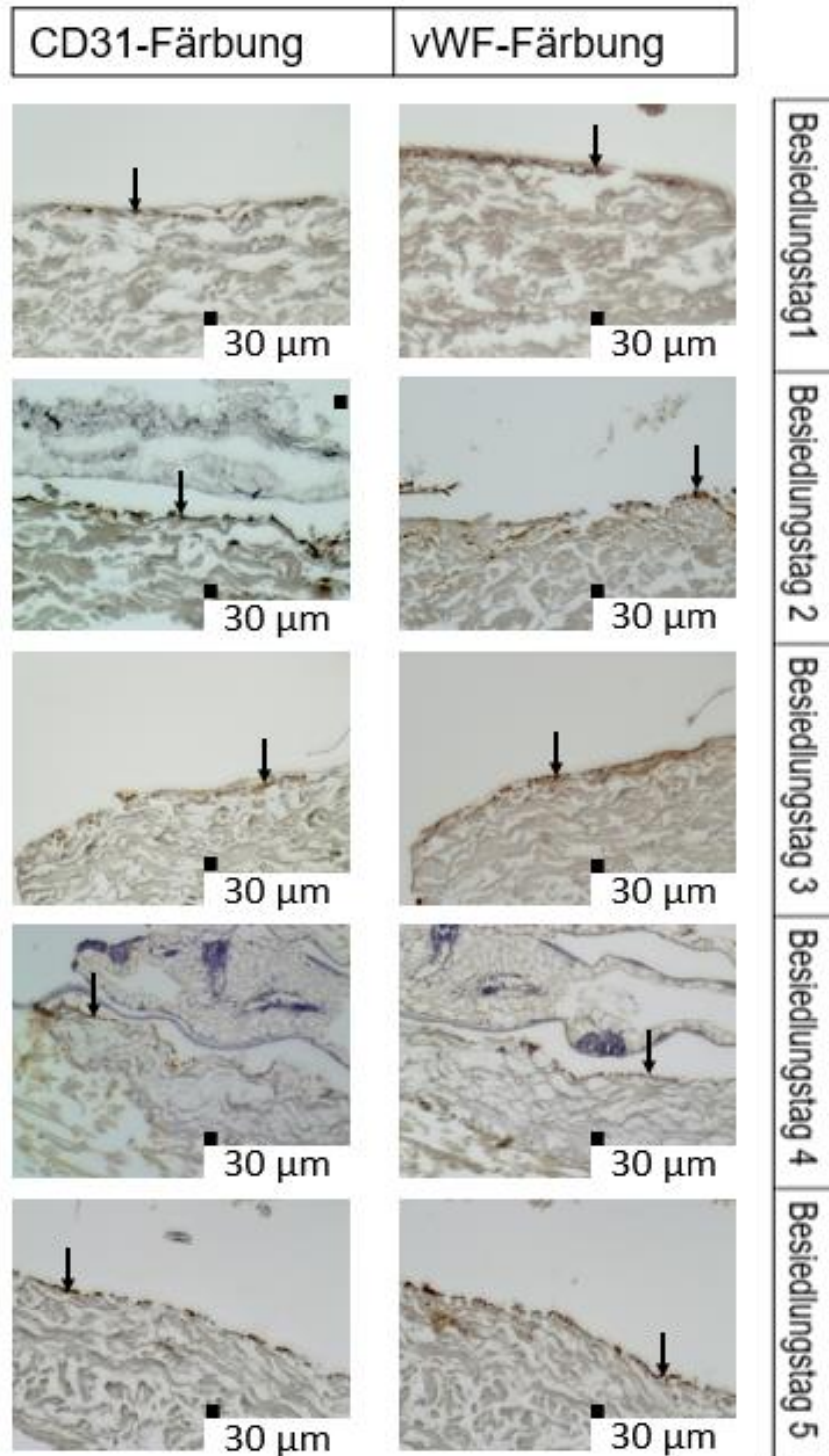


Abbildung 15: Endothelialer Monolayer nach *in vivo* CAM-Modell.

Die Bio-Gide®-Membranen wurden vor Überführung auf die CAM *in vitro* über 3 Stunden kulturell besiedelt. Die Besiedlung erfolgte auf der porösen Seite der Membran mit ECFC und MSH-Fibroblasten. Die poröse Seite hatte direkten Kontakt zur CAM. In den Abbildungen befindet sich die poröse Seite oben. Zur immunhistochemischen Färbung wurden Antikörper spezifisch für die Endothelzellmarker CD31 und vWF verwendet. Die schwarzen Pfeile deuten auf Endothelzellen im Bereich des Monolayers. 200-fache Vergrößerung, Aufnahme am Lichtmikroskop. Die Maßbalken bilden jeweils eine Länge von 30 µm ab.

4. Ergebnisse

Die 14-tägige Ko-Kultur zeigte mikroskopisch bereits ab Tag eins der Besiedlung auf dem CAM-Modell CD31-positive Anschnitte von ringförmigen Bereichen (Abb. 16). Diese entsprechen tendenziell den bereits vor den *in vivo*-Versuchen in der Immunfluoreszenz darstellbaren mikrovaskulären Strukturen. Sie zeigten mikroskopisch keine Veränderungen im Laufe der Besiedlungstage. Die mikrovaskulären Strukturen waren stets oberflächlich an der porösen Seite gelegen und von CD31- bzw. vWF-positiven Zellen begrenzt. Eine Infiltration in Richtung des Zentrums der *Bio-Gide*[®]-Membran konnte nicht nachgewiesen werden. Die Prävascularisierung beschränkte sich auf die poröse Kontaktfläche der Membran zur CAM.

Auf der porösen Seite der *Bio-Gide*[®]-Membran aufliegend zeigte sich zudem ab Tag eins der Besiedlung in allen Versuchsreihen eine dünne Gewebeschicht. Diese zeigte sich in den immunhistochemischen Antikörperfärbungen negativ für CD31 und vWF. Da die poröse Seite direkten Kontakt zur CAM hatte, kann eine Darstellung der Chorioallantoismembran vermutet werden (Abb. 16). Dies kann als direkte Verwachsung zwischen der vorkultivierten *Bio-Gide*[®]-Membran und der CAM gewertet werden. Eine solche Beobachtung gelang in der Vergleichsversuchsreihe mit kürzerer Ko-Kulturdauer nicht.

Weitere, nur durch Hämalau angefärbte Zellen mit länglichem, platten Zellkörper waren ebenfalls an der porösen Membranseite darzustellen. Diese können sowohl Fibroblasten, als auch aviäre Zellen abbilden. Die zelloklusive Seite der *Bio-Gide*[®]-Membran stellte sich zellfrei dar (Abb. 17). Sowohl Fibroblasten, als auch Endothelzellen haben die Membran im Rahmen der Prävascularisierung nicht vollständig durchwandert.

Mitunter konnte innerhalb der Anschnitte eine Ausfüllung der mikrovaskulären Strukturen beobachtet werden (Abb.16, Abb. 17). Um den Inhalt näher spezifizieren zu können, wurde eine HE-Färbung hinsichtlich des Nachweises von Erythrozyten durchgeführt.

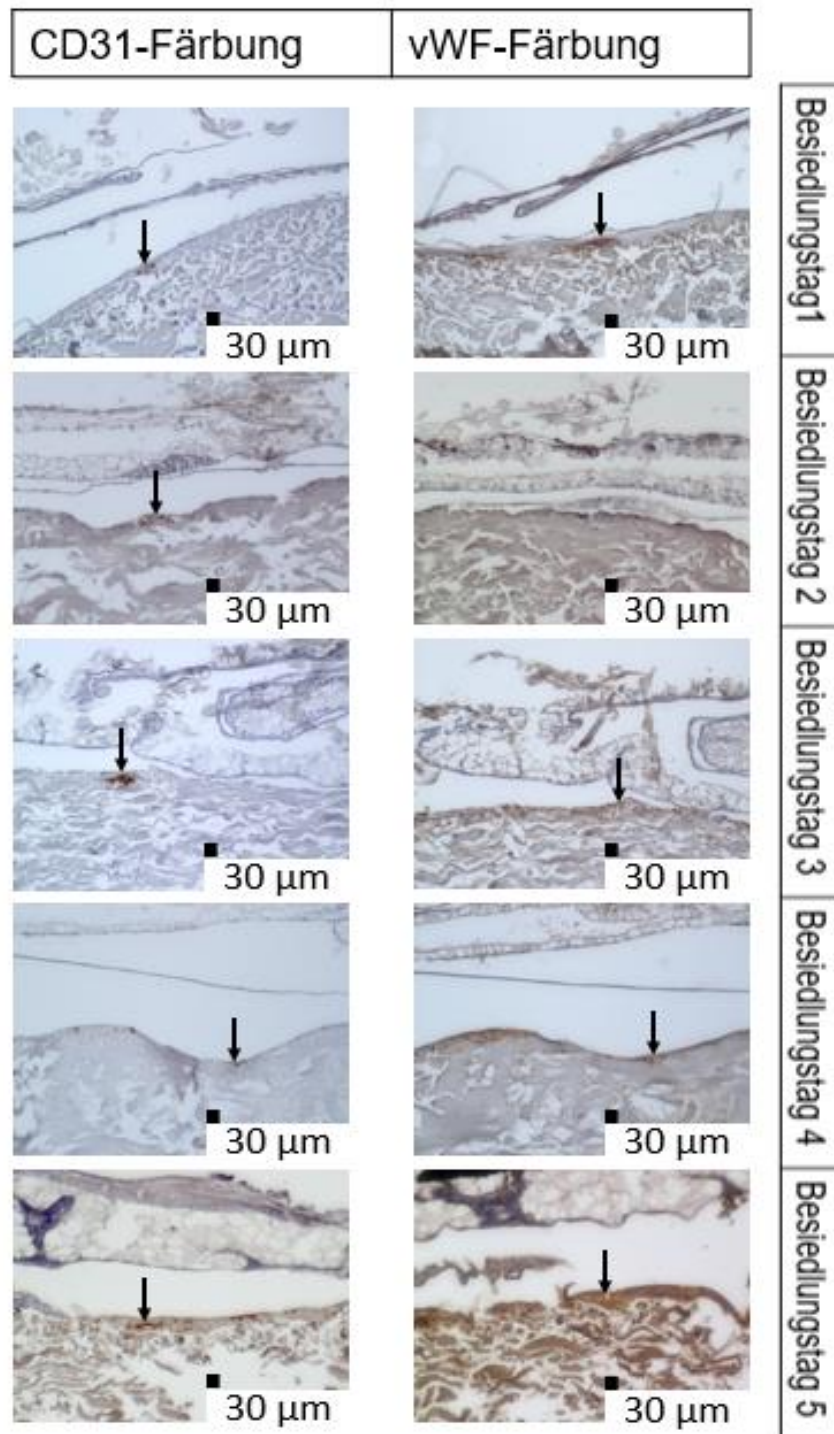


Abbildung 16: Anschnitte mikrovaskulärer Strukturen nach Inkubation der besiedelten Membran im *in vivo* CAM-Modell.

Die *Bio-Gide*[®]-Membranen wurden zuvor *in vitro* über 14 Tage prävascularisiert. Die Besiedlung erfolgte auf der porösen Seite der Membran mit ECFC und MSH-Fibroblasten. Die poröse Seite hatte direkten Kontakt zur CAM. In den Abbildungen befindet sich die poröse Seite oben. Zur Färbung wurden spezifische Antikörper der Endothelzellmarker CD31 und vWF verwendet. Die schwarzen Pfeile deuten auf gefäßähnliche Strukturen. 200-fache Vergrößerung, Aufnahme am Lichtmikroskop. Die Maßbalken entsprechen jeweils einer Länge von 30 μm .

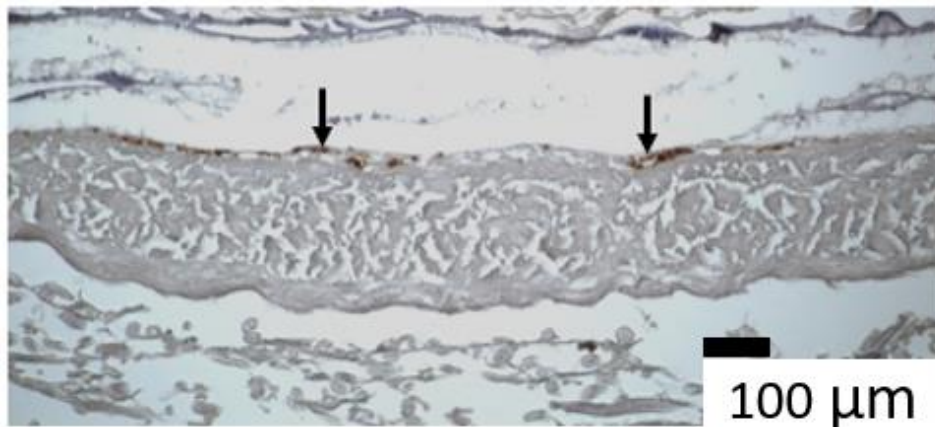


Abbildung 17: Mikrovaskuläre Strukturen nach fünf Tagen Besiedlungsdauer *in vivo*.

Die Strukturen finden sich entlang der porösen Membranseite einer über 14 Tage ko-kultivierten *Bio-Gide*[®]-Membran. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit einem CD31-Antikörper als Endothelzellmarker. Der Pfeil kennzeichnet ein Lumen innerhalb eines gefärbten Bereiches. 100-fache Vergrößerung, lichtmikroskopische Aufnahme. Der Maßbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

4.6 Intravasale Erythrozyten und aviäre Gefäßstrukturen

Die Präparate, bestehend aus vorkultivierten *Bio-Gide*[®]-Membranen und der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos, sollten mit Hilfe der HE-Färbung auf das Vorhandensein von Erythrozyten innerhalb der mikrovaskulären Strukturen untersucht werden. Weiterhin ermöglicht die HE-Färbung die Detektion aviärer Gefäßeinsprossungen. Weder innerhalb der Membranstruktur noch in den CD31- und vWF-positiven prävaskulären Strukturen der über 14 Tage ko-kultivierten Weichgewebeäquivalente konnten Erythrozyten nach den Besiedlungstagen eins bis fünf nachgewiesen werden (Abb. 18). Es ist somit davon auszugehen, dass kein Anschluss an das Gefäßsystem des Hühnerembryos erfolgte. Zudem konnten keine weiteren Gefäßstrukturen innerhalb des Konstruktes angefärbt werden. Ein Verwachsen der mikrovaskulären Strukturen mit dem Gefäßsystem des Hühnerembryos ohne Ausbildung eines Blutflusses konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

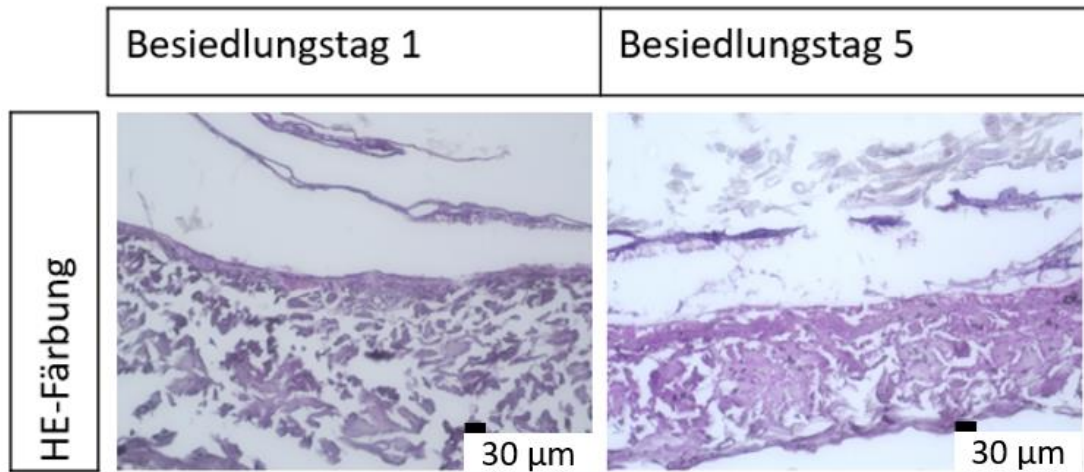


Abbildung 18: HE-gefärbte Präparate zum Nachweis von Erythrozyten.

Mittels HE-Färbung eines über 14 Tage vorkultivierten Äquivalentes nach einem und fünf Besiedlungstagen im CAM-Modell wurde das Vorhandensein von intravaskulären Erythrozyten analysiert. Es konnten keine Erythrozyten abgebildet werden. 200-fache Vergrößerung, lichtmikroskopische Aufnahme. Der Maßbalken entspricht 30 µm.

5. Diskussion

Die Bereitstellung von prävascularisierten 3D-Konstrukten und deren erfolgreiche vaskuläre Anbindung im Empfängerorganismus ist in den vergangenen Jahren zu einer zentralen Aufgabe des *Tissue Engineerings* geworden. Es sollen patientenindividuelle, geschlechtsunabhängige Implantate mit optimalen angiogenen Eigenschaften für den zukünftigen Einsatz in der rekonstruktiven Medizin erzeugt werden können. Im Fokus dieser Arbeit liegt der Anschluss von Weichgewebe-Äquivalenten mit präformiertem Mikrogefäßsystem an ein bestehendes Gefäßsystem im *in ovo* CAM-Modell.

Das Vorhandensein prävascularer Strukturen innerhalb von *Bio-Gide*[®]-Membranen erwies sich in vorangegangenen Arbeiten als förderlich für die Anbindung an ein bestehendes Gefäßsystem im *in vivo*-Versuch. Bisherige Versuche zur Entwicklung eines Mikrogefäßsystems wurden innerhalb der Arbeitsgruppe u.a. mit dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (*human dermal microvascular endothelial cells*, HDMEC) durchgeführt. Da diese aus der männlichen Vorhaut isoliert werden, ist ein autologer Einsatz für das weibliche Geschlecht ausgeschlossen. Weiterhin wäre, aufgrund der Isolationsmethode, auch für männliche Patienten eine alternative Zellquelle zu bevorzugen. Als Substitut zu HDMEC kommen andere Zellreihen mit pro-angiogenen Eigenschaften, wie Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) oder koloniebildende Endothelzellen (*endothelial colony forming cells*, ECFC) in Frage (122). Auch HUVEC sind nicht ubiquitär verfügbar. Ein Vorteil in der Verwendung von ECFC liegt insbesondere in der einfachen Gewinnung. ECFC bieten die Möglichkeit, mittels Gefäßpunktion aus dem peripher-venösen Blut einer jeden Einzelperson isoliert zu werden (123). Weiterhin verfügen sie aufgrund der Abstammung von endothelialen Progenitorzellen über ein höheres Proliferations- und Invasionspotenzial verglichen mit reifen Endothelzellen (124, 125). Hieraus resultiert die Fähigkeit zur postnatalen Neovaskularisierung, was eine ideale Voraussetzung für die Prävascularisierung im *Tissue Engineering* darstellt.

5.1 ECFC aus Vollblutisolation und deren Phänotypisierung

Für den Versuchsaufbau war zunächst eine zuverlässige Isolationsmethode von endothelialen Progenitorzellen obligat. Zu Beginn der Forschungsarbeit erfolgte die

Isolation der im Blut zirkulierenden Endothelzellen, gemäß dem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe, durch Verdünnung der Blutproben 1:1 mit DPBS. Dies führte bei keinem der drei Spender zur Ausbildung von Kolonien im Kulturzeitraum von maximal 6 Wochen und stellte ein Hemmnis für die weiteren Versuche dar. Endotheliale Progenitorzellen haben mit 0,01% bis 0,0001% im Blut nur einen geringen Anteil an der mononukleären Zellphase (126). Daraus konnte die Annahme abgeleitet werden, dass sich aufgrund der zusätzlichen Verdünnung zu wenig Vorläuferzellen in der Kultur befanden. Die Abhängigkeit des Auftretens von ECFC von der ausgesäten Zellzahl wurde bereits von Mauge et al. beschrieben (127). Aufgrund dessen erfolgte ein Isolationsversuch der Endothelzellen aus Vollblut ohne Verdünnung. Innerhalb von 9 bis 25 Tagen entstanden so bei rund 65% der Spender ECFC-Kolonien. Die in der Literatur beschriebene Ausbildung von Kolonien in 70 – 75% der Fälle konnte auch mit dem modifizierten Standardprotokoll nicht erreicht werden (128). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der genannte Prozentsatz auch andere Subpopulationen endothelialer Progenitorzellen, wie z.B. aus dem Knochenmark oder aus dem Nabelschnurblut, miteinbezieht. Von diesen ist eine höhere Isolationsquote bekannt (129). Andere Quellen berichten ebenfalls von einer Isolationsquote der ECFC von unter 70% (130, 131, 132).

Weiterhin ist von ECFC bekannt, dass sie sich interindividuell sehr unterschiedlich verhalten und ihre Anzahl im peripheren Blut mitunter vom Gesundheitszustand des Spenders abhängig ist (133). Obwohl sämtliche Spender gesund waren, wurden keine eingehenden Untersuchungen durchgeführt, um dies zu validieren. Darüber hinaus konnten andere Arbeitsgruppen nachweisen, dass sowohl das aktive als auch das passive Rauchverhalten einen negativen Einfluss auf die Proliferation und Migration sowie die tubulogenen Eigenschaften von endothelialen Progenitorzellen haben (134, 135). Für zukünftige Versuche wird angeregt, eine definierte Zellzahl der mononukleären Phase auszusäen und die Entstehung von Kolonien entsprechend im Vergleich zu dokumentieren. Weiterhin sollten Vorerkrankungen erfragt und das Rauchverhalten des Spenders dokumentiert werden.

Die primären Kolonien wurden zunächst mikroskopisch anhand ihrer kopfsteinpflasterartigen Morphologie, der zu Beginn scharfen Abgrenzung und dem Entstehungszeitraum als ECFC charakterisiert (Abb. 8). Da für die folgenden Versuche

die vaskulogenen und angiogenen Eigenschaften der ECFC entscheidend waren, erfolgte mittels Immunfluoreszenz eine genauere Charakterisierung. Zudem sollte hiermit eine Kontamination mit anderen Zelllinien ausgeschlossen werden. Trotz intensiver Forschungen zu ECFC in den vergangenen Jahren, existiert aktuell noch kein präziser Oberflächenmarker für ECFC (71). Entscheidend war für diese Arbeit vor allem die Abgrenzung zu myeloischen bzw. hämatopoetischen Zellen, da diese im Gegensatz zu ECFC nicht die Fähigkeit zur Neovaskularisierung besitzen.

Die Phänotypisierung erfolgte über die Oberflächenantigene CD14, CD31 und CD133 mittels Immunfluoreszenz. Der hämatopoetische Oberflächenmarker CD14 diene der Abgrenzung zu monozytären Zellen. CD31 ist ein universeller Marker für Endothelzellen, welcher sich erst im Zuge der Differenzierung der EPC auf der Oberfläche von ECFC ausbildet (136). Der dritte angewandte Oberflächenmarker CD133 wird von hämatopoetischen Stammzellen ausgebildet. CD133 wird im Zuge der Reifung von ECFC herunterreguliert und dient der Abgrenzung zu *early outgrowth endothelial cells* als myeloischer Zelllinie (137, 138). Da sich die Zellpopulationen negativ für die Oberflächenmarker CD14 und CD133, jedoch positiv für CD31 zeigten, lässt sich in Zusammenschau mit der Morphologie und dem Zeitpunkt des Auftretens erster Kolonien bestätigen, dass die mit der modifizierten Isolationsmethode erhaltenen Zellen als ECFC zu charakterisieren sind.

5.2 Eignung von ECFC für die Gefäßbildung in 3D-Kollagenmembranen

Wie eingangs beschrieben, ist eine ausreichende Prävaskularisierung *in vitro* förderlich für eine zügige Anbindung eines mittels *TE* generierten Äquivalentes *in vivo* (139). Es wurde bereits Bezug auf die Rolle der ECFC in der Neovaskularisierung genommen. Bekannt ist auch, dass Fibroblasten die *de novo* Gefäßbildung durch mikrovaskuläre endotheliale Progenitorzellen positiv beeinflussen (140). Bedeutsam ist hierbei vor allem die Sekretion extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen-I und Wachstumsfaktoren wie VEGF oder PDGF, welche wiederum die Angiogenese und Lumenbildung durch Endothelzellen forcieren (141). In den durchgeführten Versuchen wurde eine Ko-Kultur aus ECFC und MSH-Fibroblasten verwendet.

In der Immunfluoreszenzfärbung von CD31 sollte in verschiedenen Versuchsdurchläufen die Entstehung eines Mikrogefäßnetzwerkes innerhalb der *Bio-*

Gide[®]-Membran untersucht werden. Ein erster Versuchsaufbau verwendete Ko-Kulturen, welche drei Stunden nach Zugabe der ECFC an Ko-Kulturtag eins fixiert wurden. In einem zweiten Versuchsaufbau erfolgte die Ko-Kultivierung über 14 Tage. Der Oberflächenmarker CD31 ist Bestandteil von Interzellularverbindungen und gibt Auskunft über die zelluläre Integrität der ECFC (142). Im ersten Versuchsaufbau zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der CD31-positiven Zellen über die gesamte Membran. Erwartungsgemäß konnten keine gefäßähnlichen Strukturen detektiert werden (116). Der zweite Aufbau zeigte in allen unabhängigen Versuchsdurchgängen der Immunfluoreszenzfärbung eine Ausbildung und Verzweigung mikrovaskulärer Strukturen innerhalb des *Scaffolds*. Auch andere Arbeitsgruppen konnten in Ko-Kulturen aus dermalen Fibroblasten und endothelialen Progenitorzellen die Ausbildung vaskulärer Strukturen nach 14 Tagen nachweisen (143). Die Durchmesser der mikrovaskulären Strukturen betragen etwa 5 – 25 µm. Dies entspricht den Maßen von kapillären bzw. post-kapillären Strukturen (144, 145).

Auffällig war, dass, trotz gleichmäßiger Verteilung der Endothelzellen am ersten Ko-Kulturtag, die Prävasikularisierung an Tag 14 innerhalb der Membran unterschiedlich ausgeprägt war. In den Randbereichen der Membran waren zahlreiche Verzweigungen und größere Gefäßdurchmesser objektivierbar. Innerhalb der zentralen Bereiche schien die Entwicklung hin zu einem Gefäßnetz unterbrochen zu sein. Hier waren kürzere, gerade Gefäßabschnitte und zum Teil einzelne Zellen abbildbar. Die Vaskularisierung ist ein dynamischer Prozess. Es spielen pro- und anti-angiogene Faktoren zusammen. Somit sollte in Betracht gezogen werden, dass die Vaskularisierung an einigen Stellen, zugunsten der weiteren Entwicklung innerhalb der bereits besser ausgebildeten, mikrovaskulären Bereiche, ruhen könnte. Nichtsdestotrotz konnte eine zuverlässige Prävasikularisierung nach 14 Tagen bei allen Spendern der Versuchsreihen nachgewiesen werden.

In einem Versuchsdurchlauf ließen sich darüber hinaus CD31-positive Zellen mit fingerförmigen Ausläufern (Filopodien) abbilden. Dies kann als eindeutiger Hinweis auf die unmittelbare angiogene Aktivität der ECFC betrachtet werden (146). In der Zusammenschau konnte somit nachgewiesen werden, dass autologe ECFC grundsätzlich als Substitut für HDMEC in Bezug auf die Prävasikularisierung von

Weichgewebe-Äquivalenten geeignet sind und nach 14 Tagen gut verzweigte mikrovaskuläre Strukturen ausbilden.

5.3 Degradation der *Bio-Gide*[®]-Membran

Mit Hilfe von digitalmikroskopischen Aufnahmen der *in vivo*-Versuche sollte ein Blutfluss innerhalb der vorkultivierten *Bio-Gide*[®]-Membranen beurteilt werden. Die Membranen aller Versuchsreihen wurden über den gleichen *in vivo*-Zeitraum betrachtet. Hierbei konnte eine höhere Transluzenz der *Bio-Gide*[®]-Membranen ab dem zweiten bis dritten Besiedlungstag dokumentiert werden. Diese Beobachtung trat lediglich bei den über 14 Tagen ko-kultivierten Membranen auf.

Biologisch abbaubare Kollagenmembranen dienen bei Weichgeweberekonstruktionen als Platzhalter und sollen den Aufbau von funktionellem Gewebe durch Umbauprozesse fördern (32). Zudem sind sie bedeutend für die Zelladhäsion und die Zell-Matrix-Interaktion, was wiederum die Migration der Zellen bedingt (147). Eine physiologische Biodegradation ist bei den verwendeten Membranen erwünscht. Bei den untersuchten Membranen konnte digitalmikroskopisch jedoch keine optische Reduktion der Dicke oder der Gesamtfläche festgestellt werden. Ebenso zeigte die histologische Auswertung keinerlei strukturelle Unterschiede zur Vergleichsmembran ohne Besiedlung. Dies lässt den Schluss zu, dass ein physiologischer Abbau nicht ursächlich für die Beobachtung ist. Darüber hinaus konnten andere Arbeitsgruppen in Tiermodellen nach subkutaner Implantation zeigen, dass die Resorption von Membranen mit nicht-vernetzten Kollagenfasern erst nach etwa drei bis vier Wochen einsetzt (148, 149).

Weiterhin kann die Ausschüttung von Proteasen, wie z.B. Kollagenase, durch Bakterien zum Abbau führen (150). Es wurde bereits beschrieben, dass das CAM-Modell anfällig für Mischinfektionen sei (151). Bei den täglichen Kontrollen im Inkubator zeigten sich die Embryonen vital und es konnte keine Kontamination festgestellt werden. Abgestorbene Embryonen wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Auch der Hühnerembryo bildet Proteasen in Form von Matrix-Metalloproteasen durch Immunzellen aus (152). Dies geschieht jedoch frühestens ab dem 10. Embryonaltag und somit erst nach Beendigung der durchgeführten Versuche (153). Wie bereits beschrieben, kann bei der 14-tägigen Ko-Kultur von aktiven Endothelzellen in Bezug

auf die Neovaskularisierung ausgegangen werden. Endothelzellen bewegen sich während der Angiogenese entlang eines Sauerstoffgradienten (154). Daher könnte eine tiefergehende Infiltration durch Endothelzellen einen Abbau der Membran erklären. Wie im Zuge der Angiogenese beschrieben, wird während des Gefäßwachstums die Basalmembran abgebaut und die Extrazellulärmatrix umgebaut. Ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix ist Kollagen-Typ-I. Es kommt zur Ausschüttung von Matrix-Metalloproteasen durch die Endothelzellen, um eine Invasion zu ermöglichen (155). Matrix-Metalloproteasen lassen sich in Subtypen untergliedern, von denen einige Kollagenstrukturen abbauen (152). Eine zusätzliche Freisetzung kann auch durch Fibroblasten erfolgen (156). *Bio-Gide*[®]-Membranen substituieren die natürliche Extrazellulärmatrix. Da sie aus Kollagen-Typ-I und Kollagen-Typ-III aufgebaut sind, ist nicht auszuschließen, dass der zuvor beschriebene Prozess zu einem beginnenden Abbau der Kollagenfasern führt. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Versuchen mit Fibrinmatrizes gemacht werden (157). Eine tiefe Infiltration der Endothelzellen konnte im Rahmen der histologischen Untersuchung jedoch nicht nachgewiesen werden. Gleichwohl sollte dieser Aspekt in zukünftigen Untersuchungen weiterhin in Betracht gezogen werden.

Durch die rein mikroskopische Beobachtung der veränderten Membranbeschaffenheit ohne qualitative Untersuchungen lässt sich nicht abschließend klären, ob von einem Membranabbau gesprochen werden kann. Um die biologische Aktivität der Endothelzellen zu bestätigen, kann in zukünftigen Versuchen eine Quantifizierung von Wachstumsfaktoren im *in vivo*-Versuch erfolgen.

5.4 Beurteilung der Integration prävaskularisierter Weichgewebe-Äquivalente nach *in vivo*-Kultivierung

Für die klinische Anwendbarkeit entscheidend ist letztendlich eine zügige Integration der Gewebeäquivalente in ein bestehendes Gefäßsystem, sowie das Überleben im Empfänger (139). Dies sollte durch die immunhistochemische Untersuchung des Gefäßstatus innerhalb der Membran durch Färbungen von CD31 und von Willebrand Faktor analysiert werden. Der Endothelzellmarker CD31 wurde bereits in Abschnitt 5.1 beschrieben. Von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein hauptsächlich von Endothelzellen produziertes Protein, dessen Speicherung primär intrazellulär in Weibel-Palade-Körperchen erfolgt (158). Neben der zentralen Bedeutung in der Blutgerinnung,

widmen sich aktuelle Untersuchungen der Rolle des Faktors in der Angiogenese (159, 160).

Zudem wurden histologische Färbungen zum Nachweis von aviären Gefäßstrukturen und Erythrozyten durchgeführt. In einem Versuchsaufbau wurden die Membranen an Kulturtag eins, drei Stunden nach der Zugabe von ECFC auf die CAM, überführt. Dies diente als nicht-prävaskularisiertes Vergleichsäquivalent. Der zweite Versuchsaufbau umfasste über 14 Tage ko-kultivierte *Bio-Gide*[®]-Membranen. Die Inkubation erfolgte jeweils für fünf Tage im CAM-Modell. Dies entsprach den Embryonaltagen fünf bis neun. Die Exzision von Membranen erfolgte an jedem dieser Tage.

Die Membranen der Ko-Kultur mit Zugabe der ECFC drei Stunden vor den *in ovo*-Versuchen zeigten in den immunhistochemischen Färbungen aller Versuchstage einen Monolayer aus CD31- bzw. vWF-positiven Zellen entlang der porösen Membranseite. Eine tiefere Infiltration in die Membran konnte nicht dokumentiert werden. In einer vorangegangenen Arbeit leitete H.K. Bauer die Hypothese ab, dass eine tiefe Infiltration der Membran aufgrund des Flüssigkeitssoges zu Beginn der Besiedlung festzustellen sei (65). Die beschriebenen histologischen Vergleichsuntersuchungen der über drei Stunden ko-kultivierten Membranen zeigten bei gleicher Besiedlungsmethode jedoch einen Monolayer aus CD31⁺-vWF⁺-Zellen innerhalb des ersten Drittels auf der porösen Seite der Membran ohne tiefere Infiltration. Die vorab aufgeführte Hypothese kann somit in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. Um die Tiefeninfiltration näher zu betrachten und beeinflussen zu können, sollten weitere Modifikationen vorgenommen werden.

Weiterhin konnte in der Literatur in anderen Tiermodellen gezeigt werden, dass von der Implantation von Gewebeäquivalenten ohne mikrovaskuläres Gefäßnetz bis zum Einwachsen von Gefäßen im Zentrum einer Kollagenmembran etwa 30 – 60 Tage vergehen (161). Aufgrund der begrenzten Entwicklungsdauer der CAM, war die Entwicklung von Gefäßen in dem ersten Versuchsaufbau nicht zu erwarten (118). Dennoch konnte eine ausreichende Anzahl vitaler ECFC sowohl *in vitro* mittels CD31-Immunfluoreszenz, als auch nach den *in vivo*-Versuchen immunhistochemisch durch CD31- und vWF-positive Zellen nachgewiesen werden.

Immunhistochemische Färbungen des zweiten Versuchsaufbaus zeigten ab dem ersten Tag der *in ovo*-Kultivierung ebenfalls CD31- und vWF-positive Regionen entlang des oberen Membrandrittels der porösen Seite. Ein Durchwandern der Zellen in Richtung zelloklusiver Seite konnte hier gleichermaßen nicht registriert werden.

Die angefärbten Bereiche zeigten eine ringförmige oder längliche Anordnung unterschiedlicher Größe und bildeten zum Teil ein Lumen. In Zusammenschau mit den vorherigen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass die gefärbten Strukturen äquivalent zu den mikrovaskulären Strukturen der Immunfluoreszenz sind. Innerhalb der gefäßartigen Anordnungen war in einigen Schnitten eine „Ausfüllung“ des vermeintlichen Lumens sichtbar. Zur näheren Bestimmung erfolgten HE-Färbungen. In diesen zeigten sich die Bereiche morphologisch nicht charakteristisch für Erythrozyten. Kaessmayer et al. untersuchten Interaktionen zwischen Fibroblasten und Endothelzellen auf molekularer und subzellulärer Ebene in Bezug auf die *in vitro* Angiogenese in einem 3D-Modell über einen Beobachtungszeitraum von 20 Tagen. Die Zielsetzung bestand darin, Wechselwirkungen zwischen den Zelltypen und ihrer künstlichen Modellumgebung darzustellen und zu überwachen. Sie beschreiben wiederum auf Basis von elektronenmikroskopischen Abbildungen, tubuläre Strukturen mit zum Teil enthaltenen Vesikeln, Vakuolen und Zelldebris bei Ko-Kulturen aus Fibroblasten und reifen Endothelzellen ab Kulturtag 5 als Zeichen der angiogenen Aktivität und Entwicklung des Kapillarnetzwerkes (146). Es liegt nahe, dass dies auch in den hier durchgeführten Versuchen abgebildet werden konnte, da sich der Lumeninhalt zum Teil positiv für CD31 oder vWF zeigte und in der HE-Färbung keine Erythrozyten nachgewiesen werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit mit über 14 Tagen vorkultivierten Äquivalenten konnte ein Blutfluss innerhalb der gefäßähnlichen Strukturen nicht bestätigt werden. Möglich wäre, dass die Ausbildung und Verknüpfung der kapillarähnlichen Strukturen noch nicht ausreichend fortgeschritten waren. In der Immunfluoreszenzfärbung der über 14 Tage ko-kultivierten Membranen zeigte sich eine fehlende Ausbildung mikrovaskulärer Strukturen vor allem im zentralen Bereich der Membran. Es ist wahrscheinlich, dass sich das Mikrogefäßsystem innerhalb der *Bio-Gide*[®]-Membran zunächst weiter formierte. Dies korreliert mit Untersuchungen der Sekretion pro-angiogener Faktoren aus Ko-Kulturen von Fibroblasten und ECFC. Bei diesen zeigte sich ein

Maximalspiegel der Faktoren um den 15. Kulturtag, welcher gleichbedeutend mit einer erhöhten angiogenen Aktivität ist (114).

Um die Weichgewebeäquivalente weitergehend zu analysieren, sollte in weiteren Versuchen mittels semi-quantitativen bzw. quantitativen Auswertungsmethoden die Vaskularisierung evaluiert werden. Ferner könnten, zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen mit humanspezifischen Antikörpern, intravitale Untersuchungen mit fluoreszierenden Stoffen *in ovo* durchgeführt werden. Durch die ergänzenden Methoden lassen sich zusätzliche Aussagen zur Gefäßdichte, -länge und zum Gefäßdurchmesser treffen (162).

5.5 Methodendiskussion – *in ovo* CAM-Modell

Nachdem die Prävaskularisierung erfolgreich belegt wurde, sollte die Integration der Membranen an ein bestehendes Gefäßsystem unter weitestgehend physiologischen Bedingungen untersucht werden. Zur Betrachtung der Angiogenese eignen sich verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Modelle. Mit Hilfe von *in vivo*-Modellen können physiologische Bedingungen durch den Versuchsorganismus dargestellt werden, wie sie in der Zellkultur nicht gegeben sind (163). Das *in ovo* CAM-Modell ist aufgrund seiner einfachen Handhabung und der Möglichkeit hoher Versuchszahlen ein weit verbreitetes Angiogenesemodell (121, 153, 164). Eine Suche bei Pubmed ergab, dass sich die Publikationen zum CAM-Modell in den letzten zwei Dekaden etwa versechsfacht haben (165). Das Modell bietet bei der Verwendung von xenogenen Präparaten den Vorteil, dass der Hühnerembryo erst ab dem 11. Embryonaltag ein Immunsystem ausbildet; eine vollständige Immunantwort bleibt bis zum 18. Tag aus (164). Für die vorliegende Arbeit relevant ist zudem, dass die CAM selbst den Aufbau der Extrazellulärmatrix imitiert, so wie sie auch im Menschen zu finden ist (166).

Die Ausbildung der CAM beginnt mit dem 3. Embryonaltag. Die Bestückung der CAM mit den besiedelten Membranen erfolgte ab dem 4. Embryonaltag. Zu diesem Zeitpunkt ist die CAM noch gering ausgeprägt und füllt nicht das gesamte Betrachtungsfenster aus. Gleichzeitig befindet sich die vaskuläre Entwicklung der CAM noch in einem frühen Stadium. Einerseits kann dies aufgrund der hohen angiogenen Aktivität innerhalb des Modells vorteilhaft für die Anbindung eines mittels *TE* generierten Mikrogefäßsystems sein (151). Andererseits wird primär im Bereich der

Tumorangiogenese eine Besiedlung ab dem 9. Embryonaltag für insgesamt 7 Tage empfohlen (167, 168). Dies soll eine bessere Stabilität der CAM gewährleisten und den Zeitraum des stärksten Wachstums umfassen. Eine Vaskularisierung wird hier zwischen dem zweiten und fünften Tag der *in ovo*-Kultivierung nachgewiesen (121).

Wie bereits erwähnt, war es vor allem problematisch, die nach 3-stündiger Ko-Kultur in das CAM-Modell eingebrachten Membranen zu beurteilen. Häufig kam es, aufgrund der fehlenden Haftung und des freien Flottierens der Membran an jedem der fünf Versuchstage *in vivo*, zu Membranverlusten. Watchararat et al. dokumentierten ein Einwachsen von Gefäßen in unbesiedelten Seidenfibroin-Scaffolds nach 6 Tagen im CAM-Modell (169). Das Einsetzen der Präparate fand hier an Entwicklungstag 8 statt. Ein veränderter Versuchsaufbau mit einem späteren Beginn der *in ovo*-Versuche wäre künftig denkbar.

Bei über 14 Tagen ko-kultivierten Membranen konnte nach dem Platzieren auf der CAM keine Positionsänderung oder ein Flottieren wie bei der Vergleichskultur beobachtet werden. Die Membranen hielten während des CAM-Wachstums ihre Position. Dies lässt auf eine Haftung der vorkultivierten Membranen auf der CAM ab dem ersten Tag schließen. Digitalmikroskopisch konnte jedoch keine Integration durch die CAM dokumentiert werden. Auch in der HE-Färbung konnten keine aviären Gefäßstrukturen innerhalb der besiedelten Membranen nach der *in vivo*-Kultivierung nachgewiesen werden. Die CD31- und vWF-positiven Regionen enthielten keine Erythrozyten, was gegen eine Anbindung an die Gefäße der CAM spricht. Vorherige Versuche der Arbeitsgruppe konnten Erythrozyten innerhalb des Äquivalentes nach fünf Tagen auf der CAM darstellen (65). Die verwendeten Membranen wurden jedoch über 21 Tage ko-kultiviert, so dass von einem dichteren und feiner verzweigten Mikrogefäßnetzwerk auszugehen ist. Hierdurch steigert sich die Proliferationsrate der Endothelzellen, was zu einem schnelleren Anschluss an ein bestehendes Gefäßsystem führen kann. Gleichzeitig fehlt eine höhere Quote an Versuchsdurchgängen über 21-tägige Ko-Kulturen, um diese These vollständig zu bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Implantation der besiedelten Membranen problemlos ohne Abstoßung im CAM-Modell möglich ist. Weiterhin bietet die rasche Entwicklungszeit gute Möglichkeiten zur Untersuchung der Angiogenese

bzw. Inokulation. Für die Untersuchung der nicht-prävaskularisierten Membranen sollte ein späterer Zeitpunkt bei der Besiedlung des CAM-Modells gewählt werden, analog zu dem genannten Vorgehen anderer Arbeitsgruppen. Die Inokulation des über 14 Tage ko-kultivierten Weichgewebeäquivalentes ist durch den gezeigten Versuchsaufbau möglich. Aufgrund der Verkürzung der *in vitro*-Kultivierung auf 14 Tage, sollte eine auf sieben Tage verlängerte Kultivierung *in ovo* nochmals analysiert werden. Hiermit befindet man sich noch immer im immundefizienten Entwicklungszeitraum. Darüber hinaus konnte innerhalb der CAM zwischen Entwicklungstag 5 und 11 die höchste angiogene Aktivität nachgewiesen werden, welche mit dem vorgeschlagenen Zeitraum vollständig abgedeckt wäre (163).

6. Ausblick

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie bestätigen, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFC) als gleichwertiger Ersatz für HDMEC hinsichtlich der *in vitro*-Prävaskularisierung durch Ko-Kulturen mit MSH-Fibroblasten eingesetzt werden können. Hierfür eignet sich, wie gezeigt, auch eine kürzere Kulturdauer. In der Theorie ist für jeden Patienten die autologe Isolation möglich. Für einen flächendeckenden Einsatz sollten jedoch die interindividuellen Faktoren, welche die Isolation bzw. das Vorhandensein von ECFC im Blut beeinflussen können, genauer untersucht werden. Hierdurch kann versucht werden, eine bessere Prognose bezüglich der Isolationswahrscheinlichkeit zu geben.

Weiterhin sollte der Gefäßstatus genauer betrachtet werden. Zur Ausbildung eines vollständig funktionalen Gefäßnetzes ist auch bei Kapillaren eine muskelähnliche Zellschicht notwendig. Diese dient der Kontraktilität und besteht aus Perizyten. Für einen Nachweis wären bspw. immunhistochemische Färbungen mit alpha-Smooth Muscle Actin geeignet. Diese sollten vergleichend nach *in vitro*- und *in vivo*-Kultivierung erfolgen. Ergänzende Informationen zu den Gefäßverzweigungen, Gefäßlängen, Gefäßdurchmessern und der Gefäßdichte können quantitative Analysen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie während des *in ovo* CAM-Modells liefern.

Das hier generierte Gewebeäquivalent aus ECFC und MSH-Fibroblasten, welches über 14 Tage ko-kultiviert wurde, zeigt, dass über diesen Zeitraum funktionale, mikrovaskuläre Strukturen hergestellt werden können. Der immunhistochemische Nachweis von CD31 positiven Zellen bestätigte zudem, dass vitale Zellen nach der *in vivo*-Kultivierung vorhanden waren. Ein Nachweis von Erythrozyten als Zeichen der Inoskulation konnte histologisch jedoch nicht erfolgen. Es sollte weitergehend analysiert werden, ob eine längere Kultivierung im *in ovo* CAM-Modell bis zum 11. Embryonaltag oder eine Ko-Kulturdauer zwischen 14 und 21 Tagen zu einer Anbindung mit Erythrozytennachweis führen. Außerdem sollten Versuche im Mausmodell mit verschiedenen Kulturdauern als Vergleichsstudie erfolgen. In einem weiteren Schritt könnten ähnliche Versuchsaufbauten zusätzlich mit Epithelzellen als Tri-Kultur durchgeführt und mit den bisher erlangten Ergebnissen verglichen werden.

7. Zusammenfassung

Die Übergänge zwischen der regenerativen Medizin und dem *Tissue Engineering* sind fließend. Als aussichtsreiche Alternative zu autologem Donorgewebe rücken prävascularisierte Schleimhautäquivalente bei rekonstruktiven Eingriffen in der Gynäkologie in den Mittelpunkt. Der erfolgreiche Einsatz gelingt bereits in anderen medizinischen Fachdisziplinen. Durch sie können zusätzliche Interventionen minimiert und mit den Eingriffen verbundene Komplikationen vermieden werden. Für eine erfolgreiche Anwendung beim Patienten ist vor allem das Überleben des Äquivalentes obligat. Wesentlich ist hierfür die Etablierung einer effektiven Blutgefäßversorgung. Die Prävascularisierung bietet einen Ansatz, welcher eine kurze Anbindungsdauer des *in vitro* generierten Mikrogefäßsystems an das Gefäßsystem des Empfängers ermöglicht.

Die Analysen der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf eine Ko-Kultur aus endothelialen, koloniebildenden Zellen (ECFC) und Fibroblasten der Mundschleimhaut. Am Beginn der Studie konnte die Isolationsmethode der ECFC modifiziert und dadurch zuverlässiger gemacht werden. Darauffolgend erfolgte die Betrachtung der Prävascularisierung innerhalb einer Kollagenmatrix *in vitro* durch Immunfluoreszenzfärbungen. Die Zeitdauer der Prävascularisierung wurde hierbei auf 14 Tage verkürzt, parallel erfolgten Vergleichsuntersuchungen mit nicht prävascularisierten Membranen. Weiterhin wurde die Integration an ein bestehendes Gefäßsystem im *in ovo* CAM-Modell zwischen Entwicklungstag fünf und neun des Hühnerembryos für beide Versuchsaufbauten untersucht. Die Dokumentation der *in vivo*-Versuche erfolgte zusätzlich digitalmikroskopisch.

Die Vergleichsuntersuchungen der nicht prävascularisierten Membranen, welche über drei Stunden *in vitro* ko-kultiviert wurden, zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Endothelzellen in der Immunfluoreszenz durch CD31-Färbung. Eine Ausbildung tubulärer, gefäßähnlicher Strukturen war aufgrund der zeitlichen Begrenzung nicht zu erwarten. Nach den *in vivo*-Versuchen zeigte sich immunhistochemisch ein Monolayer bestehend aus Endothelzellen. Eine tiefere Infiltration der Zellen, wie sie durch Sogkräfte hätte auftreten können, konnte nicht nachgewiesen werden.

7. Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die Neovaskularisation *in vitro* bei mehreren, unabhängigen Spendern innerhalb von 14 Tagen erreicht werden konnte. Im *in vivo*-Modell konnte kein direkter Nachweis der Inoskulation durch das Vorhandensein von Erythrozyten erfolgen. Allerdings zeigte sich in der qualitativen Dokumentation eine Fixierung der über 14 Tage vorkultivierten, prävaskularisierten *Bio-Gide*[®]-Membranen auf der CAM, was eine Verbindung zwischen den Kompartimenten vermuten lässt. In der immunhistochemischen Analyse konnten weiterhin mittels endothelzellspezifischer Färbungen mikrovaskuläre Strukturen mit teilweiser Lumenbildung nach der *in vivo*-Kultivierung an allen Versuchstagen nachgewiesen werden.

Die Verwendung von ECFC und die Verkürzung der Prävaskularisierungsdauer zeigen, dass das Weichgewebe-Äquivalent gewinnbringend als autologes Präparat in Betracht gezogen werden kann. Durch Modifikationen des *in vivo*-Modells in folgenden Untersuchungen ist eine Inoskulation des bestehenden Versuchsaufbaus möglich.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529.
- (2) Caneparo C, Brownell D, Chabaud S, Bolduc S. Genitourinary Tissue Engineering: Reconstruction and Research Models. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(7):99. doi: 10.3390/bioengineering8070099.
- (3) Brownell D, Chabaud S, Bolduc S. Tissue Engineering in Gynecology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Oct 14;23(20):12319. doi: 10.3390/ijms232012319.
- (4) Ueda M, Tohnai I, Nakai H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial Organs*. 2001;25(3):164-71. doi: 10.1046/j.1525-1594.2001.025003164.x.
- (5) Liu J, Bian Z, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance. *Orthodontics & craniofacial Research*. 2010;13(1):11-20. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01475.x.
- (6) Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *Journal of Dental Research*. 2000;79(3):798-805. doi: 10.1177/00220345000790030301.
- (7) Kato H, Marcelo CL, Washington JB, Bingham EL, Feinberg SE. Fabrication of Large Size Ex Vivo-Produced Oral Mucosal Equivalents for Clinical Application. *Tissue Engineering. Part C, Methods*. 2015;21(9):872-80. doi: 10.1089/ten.tec.2014.0600.
- (8) Iida T, Takami Y, Yamaguchi R, Shimazaki S, Harii K. Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent based on an acellular allogeneic dermal matrix: a preliminary report of clinical application to burn wounds. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*. 2005;39(3):138-46. doi: 10.1080/0284431051006376.
- (9) Davis NF, Cunnane EM, Quinlan MR, Mulvihill JJ, Lawrentschuk N, Bolton DM, Walsh MT. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018; 1107:189-198. doi: 10.1007/5584_2017_139.
- (10) Sauerbier S, Gutwald R, Wiedmann-Al-Ahmad M, Lauer G, Schmelzeisen R. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. *Clinical oral implants research*. 2006;17(6):625-32. doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01229.x.
- (11) Bae H, Puranik AS, Gauvin R, Edalat F, Carrillo-Conde B, Peppas NA, Khademhosseini A. Building vascular networks. *Science translational medicine*. 2012;4(160):160ps23. doi: 10.1126/scitranslmed.3003688.
- (12) Lee J, Shin D, Roh JL. Use of a pre-vascularised oral mucosal cell sheet for promoting cutaneous burn wound healing. *Theranostics*. 2018;8(20):5703-5712. doi: 10.7150/thno.28754.

8. Literaturverzeichnis

- (13) Bakopoulou A. Prospects of Advanced Therapy Medicinal Products-Based Therapies in Regenerative Dentistry: Current Status, Comparison with Global Trends in Medicine, and Future Perspectives. *Journal of Endodontics*. 2020;46(9S):175-188. doi: 10.1016/j.joen.2020.06.026.
- (14) Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2004;86(7):1541-58. doi: 10.2106/00004623-200407000-00029.
- (15) Nestic D, Schaefer BM, Sun Y, Saulacic N, Sailer I. 3D Printing Approach in Dentistry: The Future for Personalized Oral Soft Tissue Regeneration. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(7):2238. doi: 10.3390/jcm9072238.
- (16) Vacanti CA. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(3):569-76. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
- (17) Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(11):5665-8. doi: 10.1073/pnas.76.11.5665.
- (18) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of Medicine*. 1994;331(14):889-95. doi: 10.1056/NEJM199410063311401.
- (19) Eaglstein WH, Iriando M, Laszlo K. A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds. A clinical experience. *Dermatologic Surgery*. 1995;21(10):839-43. doi: 10.1111/j.1524-4725.1995.tb00709.x.
- (20) Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011;2:403-30. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- (21) Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518):1241-6. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68438-9.
- (22) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023-30. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61598-6.
- (23) Katari R, Peloso A, Zambon JP, Soker S, Stratta RJ, Atala A, Orlando G. Renal bioengineering with scaffolds generated from human kidneys. *Nephron. Experimental Nephrology*. 2014;126(2):119. doi: 10.1159/000360684.

- (24) Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of medicine and life*. 2019 ;12(3):225-229. doi: 10.25122/jml-2019-0032.
- (25) Olson JL, Atala A, Yoo JJ. Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam medical journal*. 2011;47(1):1-13. doi: 10.4068/cmj.2011.47.1.1.
- (26) Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2007;4(14):413-37. doi: 10.1098/rsif.2006.0179.
- (27) Hunsberger J, Harrysson O, Shirwaiker R, Starly B, Wysk R, Cohen P, Allickson J, Yoo J, Atala A. Manufacturing road map for tissue engineering and regenerative medicine technologies. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015;4(2):130-5. doi: 10.5966/sctm.2014-0254.
- (28) Yannas IV, Burke JF, Orgill DP, Skrabut EM. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science*. 1982;215(4529):174-6. doi: 10.1126/science.7031899.
- (29) Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery* 1981;194(4):413-28. doi: 10.1097/0000658-198110000-00005.
- (30) Mertsching H, Walles T, Hofmann M, Schanz J, Knapp WH. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*. 2005;26(33):6610-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.048.
- (31) Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of Royal Society, Interface*. 2006;3(10):589-601. doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- (32) Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology*. 2000;18(1):2-9. doi: 10.1007/s003450050002.
- (33) Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *Journal of dentak research*. 2007;86(2):115-24. doi: 10.1177/154405910708600203.
- (34) Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. 2013;19(6):485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437.
- (35) Artel A, Mehdizadeh H, Chiu YC, Brey EM, Cinar A. An agent-based model for the investigation of neovascularization within porous scaffolds. *Tissue Engineering. Part A*. 2011;17(17-18):2133-41. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0571.
- (36) Wu X, Jia Y, Sun X, Wang J. Tissue engineering in female pelvic floor reconstruction. *Engineering in life sciences*. 2020;20(7):275-286. doi: 10.1002/elsc.202000003.

- (37) Zivari-Ghader T, Dolati S, Mehdizadeh A, Davaran S, Rashidi MR, Yousefi M. Recent scaffold-based tissue engineering approaches in premature ovarian failure treatment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2022;16(7):605-620. doi: 10.1002/term.3306.
- (38) Heller M, Bauer HK, Schwab R, Blatt S, Peters K, Nezi-Cahn S, Unger RE, Hasenburg A, Brenner W. The impact of intercellular communication for the generation of complex multicellular prevascularized tissue equivalents. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2020;108(3):734-748. doi: 10.1002/jbm.a.36853.
- (39) Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT. Intercellular Junctions. In: Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT, Hrsg. *Cell Biologie*. 3.Aufl. Philadelphia: Elsevier; 2017: 543 – 553. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34126-4.00031-1>.
- (40) Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 2001;(29):7-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443.
- (41) Kinikoglu B, Damour O, Hasirci V. Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin. *Journal of Artificial Organs*. 2015;18(1):8-19. doi: 10.1007/s10047-014-0798-5.
- (42) Tabatabaei F, Moharamzadeh K, Tayebi L. Fibroblast encapsulation in gelatin methacryloyl (GelMA) versus collagen hydrogel as substrates for oral mucosa tissue engineering. *Journal of oral biology and craniofacial research*. 2020;10(4):573-577. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.08.015.
- (43) Thomson PJ, Potten CS, Appleton DR. Mapping dynamic epithelial cell proliferative activity within the oral cavity of man: a new insight into carcinogenesis? *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1999;37(5):377-83. doi: 10.1054/bjom.1999.0130.
- (44) Heller M, Frerick-Ochs EV, Bauer HK, Schiegnitz E, Flesch D, Brieger J, Stein R, Al-Nawas B, Brochhausen C, Thüroff JW, Unger RE, Brenner W. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*. 2016;77:207-15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.073.
- (45) Nanci A. Oral Mucosa. In: Nanci A, Hrsg. *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*. 9. Aufl. St. Louis: Elsevier, 2018: 589 – 661. <http://dl.konkur.in/post/Book/Dentistry/Ten-Cate-Oral-Histology-Development-Structure-and-Function-9th-Edition-%5Bkonkur.in%5D.pdf> (abgerufen am 14.08.2022)
- (46) Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in Dermatology*. 2000;18(5):499-511. doi: 10.1016/s0738-081x(00)00140-1.
- (47) Gartner LP. Oral anatomy and tissue types. *Seminars in Dermatology*. 1994;13(2):68-73. PMID: 8060828.

- (48) Übersicht des Verdauungssystems - Gemeinsame Histologie des Rumpfdarmes. Amboss Online (Lernplattform), abgerufen am 16.08.2022. URL: <https://next.amboss.com/de/article/qK0ChS?q=tunica+mucosa#HkcK6c0>
- (49) Oehlke W. Anatomie und Zytologie von Mundhöhle, Nasenhöhle und Rachen. In: Oehlke W, Hrsg. Oralzytologie - Mundkarzinome frühzeitig erkennen: Praxiswissen zur Oralen Zytodiagnostik. 1.Aufl. Berlin, Boston: De Gruyter; 2019: 15 - 31. <https://doi.org/10.1515/9783110642445>
- (50) Şenel S. An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. International journal of molecular sciences. 2021;22(15):7821. doi: 10.3390/ijms22157821.
- (51) Claassen H. Die Mundhöhle. In: Claassen H, Hrsg. Kompaktwissen Kopf und Halsanatomie: für Zahnmedizinstudierende, Zahnärzte, Kiefer, Oral, Kopf- und Halschirurgen, Kieferorthopäden, Zahntechniker. 1. Aufl. Berlin, Boston: De Gruyter; 2019: 105 - 120.
- (52) Chen J, Ahmad R, Li W, Swain M, Li Q. Biomechanics of oral mucosa. Journal of the Royal Society, Interface. 2015;12(109):20150325. doi: 10.1098/rsif.2015.0325.
- (53) Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V. Gingiva. In: Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V, Hrsg. Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010: 51-54. doi: 10.1055/b-002-41840.
- (54) Ram-Liebig G, Bednarz J, Stuerzebecher B, Fahlenkamp D, Barbagli G, Romano G, Balsmeyer U, Spiegelner ME, Liebig S, Knispel H. Regulatory challenges for autologous tissue engineered products on their way from bench to bedside in Europe. Advanced drug delivery reviews. 2015;82-83:181-91. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.009.
- (55) Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2021;15(9):747-762. doi: 10.1002/term.3225.
- (56) Wang X, Wang Z, Zhai W, Wang F, Ge Z, Yu H, Yang W. Engineering Biological Tissues from the Bottom-Up: Recent Advances and Future Prospects. Micromachines (Basel). 2022;13(1):75. doi: 10.3390/mi13010075.
- (57) Extrazelluläre Matrix: Histologie. Thieme via medici (Lernplattform), abgerufen am 16.08.2022. URL: [https://viamedici.thieme.de/lernmodul/546175/530375/extrazellul%C3%A4re+matrix+histologie#:~:text=In%20der%20Grundsubstanz%20der%20extrazellul%C3%A4ren,F%C3%BCssigkeit\)%20und%20Kationen%20zu%20binden.](https://viamedici.thieme.de/lernmodul/546175/530375/extrazellul%C3%A4re+matrix+histologie#:~:text=In%20der%20Grundsubstanz%20der%20extrazellul%C3%A4ren,F%C3%BCssigkeit)%20und%20Kationen%20zu%20binden.)
- (58) Stoffwechsel der einzelnen Organe – Das Bindegewebe. In: Königshoff M, Brandenburger T, Hrsg. Kurzlehrbuch Biochemie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2018: 270 - 275.

8. Literaturverzeichnis

- (59) Dado D, Levenberg S. Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue. *Seminars in cell & developmental biology*. 2009;20(6):656-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.02.001.
- (60) Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;97:4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- (61) Schwab R, Heller M, Pfeifer C, Unger RE, Walenta S, Nezi-Cahn S, Al-Nawas B, Hasenburger A, Brenner W. Full-thickness tissue engineered oral mucosa for genitourinary reconstruction: A comparison of different collagen-based biodegradable membranes. *Journal of biomedical materials research. Part B Applied biomaterials*. 2021;109(4):572-583. doi: 10.1002/jbm.b.34724.
- (62) Schneider KH, Aigner P, Holnthoner W, Monforte X, Nürnberger S, Rünzler D, Redl H, Teuschl AH. Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia*. 2016;29:125-134. doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.038.
- (63) Allan B, Ruan R, Landao-Bassonga E, Gillman N, Wang T, Gao J, Ruan Y, Xu Y, Lee C, Goonewardene M, Zheng M. Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration in Dental and Orthopedic Applications. *Tissue Engineering Part A*. 2021;27(5-6):372-381. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0140.
- (64) Ginzberg MB, Kafri R, Kirschner M. Cell biology. On being the right (cell) size. *Science*. 2015;348(6236):1245075. doi: 10.1126/science.1245075.
- (65) Bauer HK. Etablierung und Charakterisierung eines prävascularisierten in vitro Schleimhaut-Äquivalents [Dissertation]. Mainz, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, 2017.
- (66) Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2000;44(2):333-40. doi: 10.1016/s1056-8719(00)00125-8.
- (67) Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*. 2005;23(7):821-3. doi: 10.1038/nbt0705-821.
- (68) Amirsadeghi A, Jafari A, Eggermont LJ, Hashemi SS, Bencherif SA, Khorram M. Vascularization strategies for skin tissue engineering. *Biomaterials science*. 2020;8(15):4073-4094. doi: 10.1039/d0bm00266f.
- (69) MacNeil S, Shepherd J, Smith L. Production of tissue-engineered skin and oral mucosa for clinical and experimental use. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2011;695:129-53. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0_9.
- (70) Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circulation Research*. 2009;104(5):576-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.188805.

8. Literaturverzeichnis

- (71) Díaz Del Moral S, Barrena S, Muñoz-Chápuli R, Carmona R. Embryonic circulating endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*. 2020;23(4):531-541. doi: 10.1007/s10456-020-09732-y.
- (72) Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*. 2010;10(7):505-14. doi: 10.1038/nrc2868.
- (73) Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(4):530-8. doi: 10.5966/sctm.2015-0227.
- (74) Schlichting DE, Waxman AB, O'Brien LA, Wang T, Naum CC, Rubeiz GJ, Um SL, Williams M, Yan SC. Circulating endothelial and endothelial progenitor cells in patients with severe sepsis. *Microvascular Research*. 2011;81(2):216-21. doi: 10.1016/j.mvr.2010.11.011.
- (75) Munisso MC, Yamaoka T. Circulating endothelial progenitor cells in small-diameter artificial blood vessel. *Journal of artificial organs: the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*. 2020;23(1):6-13. doi: 10.1007/s10047-019-01114-6.
- (76) Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2020;77(9):1745-1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7
- (77) Ribatti D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. *Journal of anatomy*. 2006;208(2):139-52. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00522.x.
- (78) Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology*. 2012;372(2):157-65. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.09.018.
- (79) Akbarian M, Bertassoni LE, Tayebi L. Biological aspects in controlling angiogenesis: current progress. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2022;79(7):349. doi: 10.1007/s00018-022-04348-5.
- (80) Ahmadi M, Rezaie J. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: possible therapeutic implications. *J Transl Med*. 2020;18(1):249. doi: 10.1186/s12967-020-02426-5.
- (81) Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-69. doi: 10.1182/blood-2004-07-2958.
- (82) Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 2000;6(4):389-95. doi: 10.1038/74651.
- (83) Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in

8. Literaturverzeichnis

normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology*. 2018;59(2):455-467.

(84) Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*. 2003;9(6):653-60. doi: 10.1038/nm0603-653.

(85) Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307. doi: 10.1038/nature10144.

(86) Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, Antoine T, Berkenfeld F, Ferrante F, Park H, Ehling M, Biljes D, Rocha SF, Langen UH, Stehling M, Nagasawa T, Ferrara N, Borggrefe T, Adams RH. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nature cell biology*. 2017;19(8):915-927. doi: 10.1038/ncb3555.

(87) Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S, Gerhardt H. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology*. 2010;12(10):943-53. doi: 10.1038/ncb2103.

(88) Mastrullo V, Cathery W, Velliou E, Madeddu P, Campagnolo P. Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;8:188. doi: 10.3389/fbioe.2020.00188.

(89) Naito H, Iba T, Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *International Immunology*. 2020;32(5):295-305. doi: 10.1093/intimm/dxaa008

(90) Utzinger U, Baggett B, Weiss JA, Hoying JB, Edgar LT. Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis*. 2015;18(3):219-32. doi: 10.1007/s10456-015-9461-x.

(91) Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology*. 2008;26(8):434-41. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.009.

(92) Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. 2009;15(4):455-65. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0252.

(93) Kobayashi J, Kikuchi A, Aoyagi T, Okano T. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2019;107(5):955-967. doi: 10.1002/jbm.a.36627.

(94) Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(4-5):300-11. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.004

(95) Shafiee S, Shariatzadeh S, Zafari A, Majd A, Niknejad H. Recent Advances on Cell-Based Co-Culture Strategies for Prevascularization in Tissue Engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021;9:745314. doi: 10.3389/fbioe.2021.745314.

8. Literaturverzeichnis

- (96) Fu Q, Xia B, Huang X, Wang F, Chen Z, Chen G. Pro-angiogenic decellularized vessel matrix gel modified by silk fibroin for rapid vascularization of tissue engineering scaffold. *Journal of biomedical materials research. Part A.* 2021;109(9):1701-1713. doi: 10.1002/jbm.a.37166.
- (97) Laschke MW, Menger MD. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnology Advances.* 2016;34(2):112-21. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.004.
- (98) Weigand A, Horch RE, Boos AM, Beier JP, Arkudas A. The Arteriovenous Loop: Engineering of Axially Vascularized Tissue. *European surgical research.* 2018;59(3-4):286-299. doi: 10.1159/000492417.
- (99) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
- (100) O'Neill CL, McLoughlin KJ, Chambers SEJ, Guduric-Fuchs J, Stitt AW, Medina RJ. The Vasoreparative Potential of Endothelial Colony Forming Cells: A Journey Through Pre-clinical Studies. *Frontiers in medicine.* 2018;5:273. doi: 10.3389/fmed.2018.00273.
- (101) Grisar JC, Haddad F, Gomari FA, Wu JC. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomarkers in medicine.* 2011;5(6):731-44. doi: 10.2217/bmm.11.92.
- (102) Salybekov AA, Kobayashi S, Asahara T. Characterization of Endothelial Progenitor Cell: Past, Present, and Future. *International journal of molecular sciences.* 2022;23(14):7697. doi: 10.3390/ijms23147697.
- (103) Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, Ohneda O, Randi AM, Chan JKY, Yamaguchi T, Van Hinsbergh VWM, Yoder MC, Stitt AW. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem cells translational medicine.* 2017;6(5):1316-1320. doi: 10.1002/sctm.16-0360.
- (104) Medina RJ, O'Neill CL, O'Doherty TM, Knott H, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Stitt AW. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.).* 2011;17(9-10):1045-55. doi: 10.2119/molmed.2011.00129.
- (105) Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* 2004;24(2):288-93. doi: 10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06.
- (106) Huang H, Huang W. Regulation of Endothelial Progenitor Cell Functions in Ischemic Heart Disease: New Therapeutic Targets for Cardiac Remodeling and Repair. *Frontiers in cardiovascular medicine.* 2022;9:896782. doi: 10.3389/fcvm.2022.896782.
- (107) Fujisawa T, Tura-Ceide O, Hunter A, Mitchell A, Vesey A, Medine C, Gallogly S, Hadoke PWF, Keith C, Sproul A, Roddie H, McQuaker G, Wilmut I, Mills NL, Brittan M.

8. Literaturverzeichnis

Endothelial Progenitor Cells Do Not Originate From the Bone Marrow. *Circulation*. 2019;140(18):1524-1526. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042351.

(108) Chambers SEJ, Pathak V, Pedrini E, Soret L, Gendron N, Guerin CL, Stitt AW, Smadja DM, Medina RJ. Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. *Stem cells translational medicine*. 2021;10 Suppl 2(Suppl 2):54-61. doi: 10.1002/sctm.21-0022.

(109) Schechner JS, Nath AK, Zheng L, Kluger MS, Hughes CC, Sierra-Honigmann MR, Lorber MI, Tellides G, Kashgarian M, Bothwell AL, Pober JS. In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(16):9191-6. doi: 10.1073/pnas.150242297.

(110) Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. 2018;24(1):1-24. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0127.

(111) Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007;109(11):4761-8. doi: 10.1182/blood-2006-12-062471.

(112) Shepherd BR, Enis DR, Wang F, Suarez Y, Pober JS, Schechner JS. Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(10):1739-41. doi: 10.1096/fj.05-5682fje.

(113) Bouland C, Philippart P, Dequanter D, Corrillon F, Loeb I, Bron D, Lagneaux L, Meuleman N. Cross-Talk Between Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and Endothelial Progenitor Cells (EPCs) in Bone Regeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:674084. doi: 10.3389/fcell.2021.674084.

(114) Bader CYE. Parakrine Kommunikation von primären Fibroblasten und endothelialen Progenitorzellen im Kontext der Prävasikularisierung komplexer Gewebeäquivalente [Dissertation]. Mainz, Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, 2021.

(115) Chen X, Aledia AS, Popson SA, Him L, Hughes CC, George SC. Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts. *Tissue Engineering. Part A*. 2010;16(2):585-94. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0491.

(116) Schulze C. Einsatz und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen für die Prävasikularisierung einer in vitro Schleimhaut [Diplomarbeit]. Mainz, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg – Universität, 2016.

(117) Grambow E, Sorg H, Sorg CGG, Strüder D. Experimental Models to Study Skin Wound Healing with a Focus on Angiogenesis. *Medical sciences*. 2021; 9(3):55. doi: 10.3390/medsci9030055.

- (118) Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics*. 1992; 195(4): 231-72. doi: 10.1002/aja.1001950404.
- (119) Ribatti D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an In Vivo Assay to Study Antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*. 2010; 3(3): 482-513. doi: 10.3390/ph3030482.
- (120) DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, Feinberg RN. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvascular research*. 1989. 38(2) :136-47. doi: 10.1016/0026-2862(89)90022-8.
- (121) Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology*. 2017. 70: 97-101. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.11.004.
- (122) Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007;109(11):4761-8. doi: 10.1182/blood-2006-12-062471.
- (123) Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Current protocols in stem cell biology*. 2008; Chapter 2:Unit 2C.1. doi: 10.1002/9780470151808.sc02c01s6.
- (124) Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA. Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Research*. 2003;63(18):5866-73. PMID: 14522911.
- (125) Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, Tolla-Le Port C, Leboeuf M, Charbord P, Bikfalvi A, Uzan G. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103(7):2577-84. doi: 10.1182/blood-2003-08-2770.
- (126) Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. 2005;64(1):1-8. doi: 10.1002/cyto.b.20040.
- (127) Mauge L, Sabatier F, Boutouyrie P, D'Audigier C, Peyrard S, Bozec E, Blanchard A, Azizi M, Dizier B, Dignat-George F, Gaussem P, Smadja DM. Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy*. 2014;16(2):213-24. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.09.007.
- (128) Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. 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. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2019;17(7):1190-1194. doi: 10.1111/jth.14462.

8. Literaturverzeichnis

(129) Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-60. doi: 10.1182/blood-2004-04-1396.

(130) Tura O, Skinner EM, Barclay GR, Samuel K, Gallagher RC, Brittan M, Hadoke PW, Newby DE, Turner ML, Mills NL. Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells*. 2013;31(2):338-348. doi: 10.1002/stem.1280.

(131) Kolbe M, Dohle E, Katerla D, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 2010; 16(5):877-86. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0492.

(132) Matveeva V, Khanova M, Sardin E, Antonova L, Barbarash O. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(11):3453. doi: 10.3390/ijms19113453.

(133) Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2006; 28(3):261-70. doi: 10.1002/bies.20372.

(134) Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*. 2006; 187(2): 423-32. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.009.

(135) Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, Wong ML, Jahn S, Angeli FS, Minasi P, Springer ML, Hammond SK, Glantz SA, Grossman W, Balmes JR, Yeghiazarians Y. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(18):1760-71. doi: 10.1016/j.jacc.2008.01.040.

(136) Xu QB. Endothelial progenitor cells in angiogenesis. *Sheng Li Xue Bao*. 2005;57(1):1-6. PMID: 15719128.

(137) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-958. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.952.003k27_952_958.

(138) Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(7):1572-1579. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.144972.

- (139) Smirani R, Rémy M, Devillard R, Naveau A. Engineered Prevascularization for Oral Tissue Grafting: A Systematic Review. *Tissue engineering. Part B, Reviews*. 2020; 26(4):383-398. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0093.
- (140) Odell AF, Mannion AJ. In Vitro Co-culture of Fibroblast and Endothelial Cells to Assess Angiogenesis. *Methods in molecular biology*. 2022;2441:277-286. doi: 10.1007/978-1-0716-2059-5_21.
- (141) Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CC. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular biology of the cell*. 2011; 22(20):3791-800. doi: 10.1091/mbc.E11-05-0393.
- (142) Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*. 2014; 355(3):607-19. doi: 10.1007/s00441-013-1779-3.
- (143) Costa-Almeida R, Gomez-Lazaro M, Ramalho C, Granja PL, Soares R, Guerreiro SG. Fibroblast-endothelial partners for vascularization strategies in tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*. 2015; 21(5-6):1055-65. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0443.
- (144) Augustin HG, Koh GY. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science*. 2017;357(6353):eaal2379.: doi: 10.1126/science.aal2379.
- (145) Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *European cells & materials*. 2007;14:1-18; discussion 18-9. doi: 10.22203/ecm.v014a01.
- (146) Kaessmeyer S, Sehl J, Khiao In M, Merle R, Richardson K, Plendl J. Subcellular Interactions during Vascular Morphogenesis in 3D Cocultures between Endothelial Cells and Fibroblasts. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(12):2590. doi: 10.3390/ijms18122590.
- (147) Chen H, Liu Y, Jiang Z, Chen W, Yu Y, Hu Q. Cell-scaffold interaction within engineered tissue. *Experimental cell research*. 2014;323(2):346-51. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.028.
- (148) Bozkurt A, Apel C, Sellhaus B, van Neerven S, Wessing B, Hilgers RD, Pallua N. Differences in degradation behavior of two non-cross-linked collagen barrier membranes: an in vitro and in vivo study. *Clinical oral implants research*. 2014; 25(12):1403-11. doi: 10.1111/clr.12284.
- (149) An YZ, Kim YK, Lim SM, Heo YK, Kwon MK, Cha JK, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Physicochemical properties and resorption progress of porcine skin-derived collagen membranes: In vitro and in vivo analysis. *Dental materials journal*. 2018;37(2):332-340. doi: 10.4012/dmj.2017-065.
- (150) Shekhter AB, Balakireva AV, Kuznetsova NV, Vukolova MN, Litvitsky PF, Zamyatnin AA Jr. Collagenolytic Enzymes and their Applications in Biomedicine. *Current medicinal chemistry*. 2019;26(3):487-505. doi: 10.2174/0929867324666171006124236.

8. Literaturverzeichnis

- (151) Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nature protocols*. 2006;85-91. doi: 10.1038/nprot.2006.13.
- (152) Zijlstra A, Aimes RT, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, Deryugina EI, Quigley JP. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(26):27633-45. doi: 10.1074/jbc.M313617200.
- (153) Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental cell research*. 2014; 328(2): 314-24. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.010.
- (154) Wong BW, Marsch E, Treps L, Baes M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. *The EMBO Journal*. 2017;36(15):2187-2203. doi: 10.15252/emj.201696150.
- (155) Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation research*. 2020; 127(2): 310-329. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316851.
- (156) Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in pharmacology*. 2018; 81: 241-330. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.
- (157) Bleiziffer O, Hammon M, Naschberger E, Lipnik K, Arkudas A, Rath S, Prymachuk G, Beier JP, Stürzl M, Horch RE, Kneser U. Endothelial progenitor cells are integrated in newly formed capillaries and alter adjacent fibrovascular tissue after subcutaneous implantation in a fibrin matrix. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011; 15(11):2452-61. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01247.x.
- (158) de Jong A, Weijers E, Dirven R, de Boer S, Streur J, Eikenboom J. Variability of von Willebrand factor-related parameters in endothelial colony forming cells. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2019;17(9):1544-1554. doi: 10.1111/jth.14558.
- (159) Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, Payne EM, Haskard DO, Hughes AD, Cutler DF, Laffan MA, Randi AM. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood*. 2011;117(3):1071-80. doi: 10.1182/blood-2010-01-264507.
- (160) Mojzisch A, Brehm MA. The Manifold Cellular Functions of von Willebrand Factor. *Cells*. 2021;10(9):2351. doi: 10.3390/cells10092351.
- (161) Ghanaati S, Schlee M, Webber MJ, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, Görlach C, Stupp SI, Sader RA, Kirkpatrick CJ. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. *Biomedical materials*. 2011; 6(1):015010. doi: 10.1088/1748-6041/6/1/015010.
- (162) Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, van Zandvoort M, De Spiegelaere W, Lambrichts I, Bronckaers A. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue

Engineering: Focus on Stem Cells. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. 2020;26(6):519-539. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0048.

(163) Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of development*. 2016; 141:70-77. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003.

(164) DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu HC, Harrington DA, Yu W, Lewis MT, Sikora AG. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *American journal of cancer research*. 2018; 8(8):1642-1660. PMID: 30210932.

(165) Suche nach ‚chorioallantoic membrane assay angiogenesis‘, abgerufen am 14.08.2022

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=chorioallantoic%20membrane%20assay%20angiogenesis&timeline=expanded>.

(166) Kennedy DC, Coen B, Wheatley AM, McCullagh KJA. Microvascular Experimentation in the Chick Chorioallantoic Membrane as a Model for Screening Angiogenic Agents including from Gene-Modified Cells. *International journal of molecular sciences*. 2021; 23(1):452. doi: 10.3390/ijms23010452.

(167) Kunz P, Schenker A, Sähr H, Lehner B, Fellenberg J. Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable in vivo model for the analysis of osteosarcoma. *PLoS One*. 2019; 14(4):e0215312. doi: 10.1371/journal.pone.0215312.

(168) Sys GM, Lapeire L, Stevens N, Favoreel H, Forsyth R, Bracke M, De Wever O. The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma. *Journal of visualized experiments*. 2013; (77):e50522. doi: 10.3791/50522.

(169) Watchararot T, Prasongchean W, Thongnuek P. Angiogenic property of silk fibroin scaffolds with adipose-derived stem cells on chick chorioallantoic membrane. *Royal Society open science*. 2021; 8(3):201618. doi: 10.1098/rsos.201618.

(170) Caballero Aguilar LM, Silva SM, Moulton SE. Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of controlled release*. 2019; 306:40-58. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.028.

(171) Grimsby GM, Baker LA. The use of autologous buccal mucosa grafts in vaginal reconstruction. *Current Urology Reports*. 2014; 15(8):428. doi: 10.1007/s11934-014-0428-z. PMID: 24948036.

(172) Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*. 2005; 16(3):369-78. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x.

(173) Troy E, Tilbury MA, Power AM, Wall JG. Nature-Based Biomaterials and Their Application in Biomedicine. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(19):3321. doi: 10.3390/polym13193321.

9. Tabellarischer Lebenslauf

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

10. Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]