

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

Die Rolle von Thrombospondin-1 bei der Biomaterialintegration poröser
Polyethylenimplantate in vivo

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

vorgelegt von

Alexander Philippe Maas
aus Wiesbaden

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion: 27.05.2024

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
3	EINLEITUNG	5
4	LITERATURDISKUSSION	10
4.1	PORÖSES POLYETHYLEN IN DER PLASTISCH-REKONSTRUKTIVEN CHIRURGIE	10
4.2	BIOMATERIALINTEGRATION	11
4.3	ANGIOGENESE	17
4.4	STRATEGIEN ZUR OPTIMIERUNG DER BIOMATERIALINTEGRATION VON IMPLANTATEN AUS PORÖSEM POLYETHYLEN	20
4.5	MATRIZELLULÄRE PROTEINE	24
4.6	THROMBOSPONDIN-1	25
4.7	MODELL DER TRANSPARENTEN RÜCKENHAUTKAMMER UND HEN´S EGG TEST ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE	27
5	MATERIAL UND METHODEN	31
5.1	VERSUCHSPROTOKOLLE	32
5.1.1	Versuchsprotokoll zu Versuch 1: Modell der transparenten Rückenhautkammer	32
5.1.2	Versuchsprotokoll zu Versuch 2: Hen´ s egg test on chorioallantoic membrane	33
5.2	ZUSCHNEIDEN DER IMPLANTATE AUS PORÖSEM POLYETHYLEN	34
5.3	VERSUCH 1: MODELL DER TRANSPARENTEN RÜCKENHAUTKAMMER	34
5.3.1	Präparation der transparenten Rückenhautkammer	34
5.3.2	Einbringung der Implantate aus porösem Polyethylen in die transparente Rückenhautkammer	37
5.3.3	Intravitalmikroskopie in der transparenten Rückenhautkammer:	38
5.3.4	Intravenöse Applikation der Fluorophore und Tracer	41
5.3.4.1	Applikation von Fluorescein Isothiocyanat–dextran (FITC- Dextran)	42
5.3.4.2	Applikation von Rhodamin 6G	42
5.3.4.3	Thrombozytenisolation aus isogenen Spendertieren und Färbung mit 5[6] Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE)	43
5.3.5	Bildanalyse	44
5.3.5.1	Gefäßparameter im Modell der transparenten Rückenhautkammer	44
5.3.5.2	Leukozyten-Endothelinteraktion	45
5.3.5.3	Thrombozyten-Endothelinteraktion	46
5.3.5.4	Mechanische Verankerung der Implantate im Gewebe	46
5.3.6	Histologische Fixierung	47
5.3.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	47
5.4	VERSUCH 2: HEN´ S EGG TEST ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE	48
5.4.1	Intravitalmikroskopie	49
5.4.2	Bildanalyse	49

5.4.2.1	Gefäßparameter im CAM Assay	49
5.4.2.2	Qualitative Auswertung der Integrationsgrade der eingebrachten Implantate aus porösem Poylethylen.....	50
5.5	BIOMETRIE UND STATISTIK	51
6	ERGEBNISSE	53
6.1	VERSUCH 1: MODELL DER TRANSPARENTEN RÜCKENHAUTKAMMER:.....	53
6.1.1	Gefäßparameter	53
6.1.1.1	Funktionelle Gefäßdichte im Implantat.....	53
6.1.1.2	Funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager	55
6.1.2	Gefäßverzweigungen und Gefäßäste.....	56
6.1.2.1	Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat.....	56
6.1.2.2	Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager	58
6.1.2.3	Leukozyten-Endothelinteraktion	60
6.1.3	Dynamische Desintegrationskraft.....	63
6.1.4	Thrombozyten-Endothelinteraktion.....	63
6.1.5	Histologische Fixierung	63
6.2	VERSUCH 2: HEN´S EGG TEST ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE	64
6.2.1	Funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager	64
6.2.2	Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager	66
6.2.3	Qualitative Implantatintegration	70
6.2.4	Versuchsgruppenanalyse	72
6.2.5	Histologische Fixierung	73
7	DISKUSSION	74
7.1	VERSUCH 1: MODELL DER TRANSPARENTEN RÜCKENHAUTKAMMER.....	74
7.1.1	Gefäßparameter	74
7.1.2	Leukozyten-Endothelinteraktion	75
7.1.3	Explorative Thrombozytentransfusion und Evaluation der Thrombozyten-Endothelinteraktion	77
7.1.4	Dynamische Desintegrationskraft.....	77
7.2	VERSUCH 2: HEN´S EGG TEST ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE	78
7.2.1	Gefäßparameter	78
7.2.2	Qualitative Implantatintegration	80
7.2.3	Versuchsgruppenanalyse	80
7.3	AUSBLICK	81
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
9	LITERATURVERZEICHNIS	85
10	ANHANG	98
10.1	TABELLEN.....	98
10.2	ANZEIGE VORVERÖFFENTLICHTER ERGEBNISSE	126
11	DANKSAGUNG.....	127
12	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	128

1 Abkürzungsverzeichnis

AA = Acrylsäure
 AN = Albumin Nanopartikel
 ANG-1 = Angiopoetin-1
 ANG-2 = Angiopoetin-2
 APC = Antigen-präsentierende Zelle
 CAM = Chorioallantoismembran
 CAM Assay = Hen´s egg test on chorioallantoic membrane
 CD47 = Cluster of differentiation 47
 CD99 = Cluster of differentiation 99
 CFDA-SE = Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
 CTGF = Connective tissue growth factor
 DAMP = Danger-associated molecular pattern
 DC = dendritische Zelle
 DDS = Drug-Delivery-System
 DSC = transparente Rückenhautkammer
 ECM = Extrazelluläre Matrix
 ESAM = Endothelial cell-selective adhesion molecule
 FDA = United States Food and Drug Administration
 FGF-2 = Basic fibroblast growth factor
 FITC = Fluorescein Isothiocyanate-Dextran
 fps = frames per second
 fvd = functional vessel density
 GFP = grün fluoreszierendes Protein
 HMEC = Human mammary epithelial cell
 ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule 1
 ICAM-2 = Intercellular adhesion molecule 1
 IL-12 = Interleukin 12
 IL-18 = Interleukin 18
 IL-1 β = Interleukin 1 β
 K.O.-Maus = Knockout-Maus
 MALP-2 = Macrophage-activating lipopeptide 2
 MIA = Multi image array (Mehrfachbild-Anordnung)
 MMP = Matrix-Metalloproteinease
 MP+ = Medpor® PLUS™
 mRNA = messenger-Ribonukleinsäure
 MVF = mikrovaskuläre Fragmente
 NaCl = Natriumhydrochlorid
 NF- κ B = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NO = Stickstoffmonoxid
 eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
 iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
 PAI-1 = Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
 PAMP = Pathogen-associated molecular pattern
 PDGF-B = Platelet-derived growth factor B
 PECAM-1 = Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
 PLGA = Polylactid-co-Glykolid
 PPE = poröses Polyethylen
 PPP = thrombozytenreiches Plasma
 PRP = thrombozytenarmes Plasma

PRR = Pattern recognition receptors
RGD = Arginylglycylasparaginsäure
ROI = Region of interest
TARC = Translational Animal Research Center der Universitätsmedizin Mainz
TFA = Tube formation assay
TGF- β 1 = Transforming growth factor β 1
TLR = Toll-like-Rezeptor
TLR-4 = Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α = Tumornekrosefaktor- α
tPA = gewebespezifischer Plasminogen Aktivator
TSP-1 = Thrombospondin-1
uPA = Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF-A = Vascular endothelial growth factor A

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Historische Zeichnung des prä- und postoperativen Befundes einer Rhinoplastik mittels paramedianem Stirnklappen.....	6
Abbildung 2: Zweiteilige Gerüste aus PPE zur Ohrmuschelrekonstruktion.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Leukozytenextravasation.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vessel Sproutings.....	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der intussuszeptiven Angiogenese.....	19
Abbildung 6: Struktur des Thrombospondin-1 Monomeres.....	25
Abbildung 7: Graphische Darstellung des Versuchsprotokolles von Versuch 1.....	32
Abbildung 8: Graphische Darstellung des Versuchsprotokolles von Versuch 2.....	33
Abbildung 9: Aufbau des Titanrahmens der transparenten Rückenhautkammer.....	34
Abbildung 10: Darstellung der Präparation der transparenten Rückenhautkammer.....	36
Abbildung 11: Multi image array des Beobachtungsfeldes der Rückenhautkammer im grünfluoreszenten Kanal unmittelbar nach Kammerpräparation.....	37
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des Beobachtungsfeldes der transparenten Rückenhautkammer nach Implantateinbringung.....	38
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Positionierung des Versuchstieres auf dem XY-Präzisionstisch.....	39
Abbildung 14: Mutli image array mit Projektion der Regions of interest auf Implantat und Implantatlager.....	40
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Mikroskop-Arbeitsplatzes.....	41
Abbildung 16: Multi image array des Beobachtungsfeldes der transparenten Rückenhautkammer nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran.....	42
Abbildung 17: Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktion.....	42
Abbildung 18: Aggregation CFDA-SE markierter Thrombozyten 10min nach Applikation. ...	43
Abbildung 19: Anwendung des Plugins "Skeletonize".....	45
Abbildung 20: Nachzeichnung eines Gefäßplexus.....	45
Abbildung 21: Ermittlung der Dynamischen Desintegrationskraft.....	47
Abbildung 22: Schematische Darstellung eines PPE-Implantates auf der Chorioallantoismembran.....	48
Abbildung 23: Konstruierte Übersichtsaufnahme eines PPE-Implantates auf der Chorioallantoismembran.....	50
Abbildung 24: CAM Assay: Systematik der qualitativen Analyse der Implantat- Integration.....	51
Abbildung 25: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantat.....	54
Abbildung 26: Boxplots der Änderung der funktionellen Gefäßdichte im Implantat.....	54
Abbildung 27: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager.....	55
Abbildung 28: Gefäßplexus im Implantat an Versuchstag 14.....	56
Abbildung 29: Boxplots der Gefäßverzweigungen im Implantat.....	57
Abbildung 30: Boxplots der Gefäßäste im Implantat.....	57
Abbildung 31: Boxplots der Gefäßverzweigungen im Implantatlager.....	59
Abbildung 32: Boxplots der Gefäßäste im Implantatlager.....	59
Abbildung 33: Säulendiagramme des Anteils der statischen an den Gesamtleukozyten im Implantatlager.....	61
Abbildung 34: Säulendiagramme des Anteils der rollenden und statischen Leukozyten an den Gesamtleukozyten im Implantatlager.....	62
Abbildung 35: Säulendiagramme der intravaskulären Leukozyten im Implantatlager.....	62
Abbildung 36: CFDA-SE markierte Thrombozyten im Implantatlager unmittelbar nach Applikation.....	63
Abbildung 37: Aggregation CFDA-SE markierter Thrombozyten 10min nach Applikation. ...	63

Abbildung 39: CAM Assay: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager an Versuchstag 7.....	65
Abbildung 40: CAM Assay: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager an Versuchstag 10.....	65
Abbildung 41: CAM Assay: Überlappung des Implantates durch Gefäße an Versuchstag 10.	67
Abbildung 42: CAM Assay: Boxplots der Gefäßverzweigungen pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 7.....	68
Abbildung 43: CAM Assay: Boxplots der Gefäßverzweigungen pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 10.....	68
Abbildung 44: CAM Assay: Boxplots der Gefäßäste pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 7.....	69
Abbildung 45: CAM Assay: Boxplots der Gefäßäste pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 10.....	69
Abbildung 46: CAM Assay: Säulendiagramme der Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 7.....	71
Abbildung 47: CAM Assay: Säulendiagramme der Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 10.....	71
Abbildung 48: CAM Assay: Kreisdiagramme Versuchsgruppenanalyse.....	73
Abbildung 49: CAM Assay: Einzelaufnahme des Implantatrandes nach TRITC-Dextran-Applikation an Versuchstag 10.....	78

3 Einleitung

Bereits das auf Sanskrit verfasste Buch „Sushruta Samhita“ enthält die detaillierte Schilderung einer Rhinoplastik durch Defektdeckung mit einem paramedianen Stirnlappen um das Jahr 600 v.Chr. in Indien (Champaneria et al., 2014, Bath et al., 2019). Die Notwendigkeit solch fortgeschritten anmutender chirurgischer Fertigkeiten lag auch darin begründet, dass die Strafmaßnahme der Nasen-Amputation als demütigende und bloßstellende Mutilierung niederschwellig ausgesprochen wurde und dementsprechend ein hoher Bedarf bestand (Greig et al., 2015, Mazzola and Mazzola, 2014). Knappe zweitausend Jahre später, zu Beginn des 15. Jahrhunderts, fand diese alt-indische Technik, die wahrscheinlich durch arabische Texte nach Europa transportiert wurde, Anwendung durch die sizilianische Familie Branco, die sie weiterentwickelte und letztlich auch ferngestielte Lappen von der Oberarminnenseite zur Defektdeckung im zentralen Gesichtsbereich verwendete (Greco et al., 2010). Der Deutschordensritter Heinrich von Pfalzpaint beschreibt in seinem Buch „Bündth-Ertzney“ („Wundarzney“) 1460 schließlich sogar detailliert eine dreischnittige Operationstechnik zur Rhinoplastik mittels ferngestieltem Lappen in 14 Tagen. Durch die limitierte, weil in der Regel exklusiv vertikale Wissensweitergabe von Meister zu Schüler, ging das Wissen um diese Techniken jedoch zunächst verloren (Greig et al., 2015). Carl Ferdinand von Graeve legte dann 1818 mit der Veröffentlichung des Buches „Rhinoplastik“ wahrscheinlich die Grundlage, dass der Begriff Rhinoplastik in den medizinischen Sprachgebrauch einzog (Bennett, 1983). Die Kriege des späten 19. und frühen 20. Jahrhunderts und insbesondere der erste Weltkrieg führten zu einer sehr hohen Inzidenz an Schussverletzungen im exponierten Kopf- und Halsbereich durch die Verwendung von Explosivmunition und Hochgeschwindigkeitsprojektilen verbunden mit dem zunehmenden Kampf in Schützengräben. Dies führte zur zunehmenden Relevanz plastisch-rekonstruktiver Gesichtschirurgie und kanalisierte die Herausbildung der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie als eigenständige Fachrichtung (Simpson and David, 2004).



Abbildung 1: Historische Zeichnung des prä- und postoperativen Befundes einer Rhinoplastik mittels paramedianem Stirnlappen.

Die Zeichnung entstammt der 1818 von Carl Ferdinand von Graefe vorgelegten Schrift „Rhinoplastik oder die Kunst den Verlust der Nase organisch zu ersetzen, in ihren früheren Verhältnissen erforscht und durch neue Verfahrungsweisen zur höheren Vollkommenheit gefördert“ und wird von Graefe darin wie folgt beschrieben: „Die Gestalt der wiedergebildeten Nase, wie sie in der sechsten Woche nach der Operation erschien, ist auf das sorgsamste nach der Natur abgebildet. Auf der rechten Seite der Nase bemerkt man nach der Wange hin, mehrere Faltungen, die Überbleibsel der Narben sind, welche nach Heilung des Gesichtskrebses entstanden waren. Auch sieht man die Stirnnarbe, die sich späterhin noch bei weitem mehr zusammenzog, genau in der Größe, die sie in der sechsten Woche nach der Operation hatte.“ (von Gräfe, 1818).

Rekonstruktionen im Kopf-Hals-Bereich sind heutzutage zur Korrektur von durch Malignome und andere pathologische Prozesse oder Gewalteinwirkung bedingten Gewebeschäden oder von angeborenen Fehlbildungen unabdingbar (Chuang et al., 2016, Cuccolo et al., 2019, Narayan and Ariyan, 2001).

Die klinische Relevanz ergibt sich einerseits aus der hohen Inzidenz mutilierender Erkrankungen wie beispielsweise des Basalzellkarzinoms (Gesamtinzidenz in Europa: 65/100000; in Australien: 726/100000), das sich zu 80 - 85% im Kopf-Hals-Bereich manifestiert. Des Weiteren erfordern traumatische Schädigungen oder angeborene Fehlbildungen wie Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (10 – 20 / 10000 Geburten) sowie Anotie oder Mikrotie (0,83 – 17,4 / 10000 Geburten) plastisch-rekonstruktive Verfahren im Kopf-Hals-Bereich (Hillig, 1991, Luquetti et al., 2012, Sartore et al., 2011).

Neben funktionellen Einschränkungen bedingt ein von der Norm abweichendes Erscheinungsbild psychosozialen Leidensdruck (Singh and Moss, 2015). So weisen 30 bis 40% der Kinder mit kranio-maxillären Abnormalitäten Auffälligkeiten in der Problemverarbeitung auf, leiden unter Impulskontrollstörungen, haben ein gestörtes Lernverhalten oder weisen generell eine verringerte Sozialkompetenz infolge des sozialen Rückzugs auf (Endriga and Kapp-Simon, 1999). In einer Kohorte von 170 PatientInnen mit Mikrotie wurde in acht- bis zehnjährigen und 14- bis 16-jährigen männlichen Patienten Aggression und soziale Probleme signifikant häufiger

beobachtet und in 17-jährigen oder älteren weiblichen Patienten traten signifikant mehr Depressionen auf im Vergleich zu einer hinsichtlich der Matching-Kriterien Alter und Geschlecht angepassten Kontrollgruppe (Li et al., 2010). Aus einer Kohorte von 55 Kindern, die operativ nach Lippen-Kiefer-Gaumenspalten unterschiedlicher Ausprägung versorgt wurden, gaben 69% an, diesbezüglich in der Schule gehänselt worden zu sein und 47% äußerten den Wunsch nach Änderungen im Gesichtsbereich (Lorot-Marchand et al., 2015).

Zwar können die beschriebenen Folgen durch familiären Rückhalt und positive Beziehungen zu Gleichaltrigen abgemildert werden, jedoch stehen diese Ressourcen oft auch kulturell tradiert vielen Kindern nicht zur Verfügung (Hickey and Salter, 2006).

Bei Defektdeckung im Kopf-Hals-Bereich ist individuellen Faktoren wie individueller Hautbeschaffenheit, Textur, Dicke, Elastizität und Oberflächenbeschaffenheit von Geweben im besonderen Maße Rechnung zu tragen (Kupilas and Kleinheinz, 2019).

Zudem stellt die dreidimensionale Rekonstruktion kranio-maxillärer Gewebedefekte, wie sie etwa im Rahmen der Ohrmuschelkonstruktion oder Rhinoplastik erforderlich ist, aufgrund der Bradytrophie des Gewebes aber auch aufgrund der besonderen mechanischen Beanspruchung im Alltag eine besondere Herausforderung dar. Um den genannten strukturellen, funktionellen und ästhetischen Anforderungen gerecht zu werden, ist der Einsatz biokompatibler Gerüstsubstanzen unabdingbar. Als solche dienen typischerweise autologe Transplantate aus Knorpel- und Knochengewebe oder Fett- und Muskelgewebe (Sajjadian et al., 2010), daneben aber auch alloplastische Grafts (Goodrich et al., 2012).

Am Beispiel der Transplantatgewinnung aus Rippenknorpel lassen sich exemplarisch die Problemkonstellationen, die sich aus der Verwendung autologer Transplantate ergeben, aufzeigen. So findet Rippenknorpel insbesondere zur Deckung größerer Gewedefekte Verwendung (Moshaver and Gantous, 2007). Bei der Entnahme können ausgeprägte Hebedefekte in Form von Pneumothorax, Deformitäten des Thorax, Serombildung, anhaltendem Schmerz, Infektion und Keloidbildung auftreten (Yang et al., 2015). Diese Komplikationen werden von einigen Experten als häufig beschrieben (Moon et al., 2012). Zudem sind die bei Verwendung von autologen Rippenknorpel erzielten ästhetischen Ergebnisse aufgrund struktureller Unzulänglichkeiten nicht flächendeckend überzeugend (Moon et al., 2012). Typische Komplikationen autologer Grafts nach Implantation sind die postoperative Verformung, die Extrusion, die Resorption oder auch Frakturierung des Grafts (Varadharajan et al., 2015). In einer Meta-Analyse zum Einsatz des autologen Rippenknorpels zur Rhinoplastik zeigte sich, dass in 14 % aller Fälle eine Revisionsoperation erfolgte (Wee et al., 2015).

Eine Alternative zur Verwendung autologer Transplantate stellt der Einsatz alloplastischer Materialien dar. Diese haben den prinzipiellen Vorteil, nicht mit einem Hebedefekt einherzugehen. Zudem reduziert sich durch ihren Einsatz die Anzahl der notwendigen chirurgischen Schritte, was mit einer kürzeren Operationsdauer einhergeht (Berghaus et al., 2010, Stephan and Reinisch, 2018). Die in der rekonstruktiven Gesichtschirurgie eingesetzten alloplastischen Materialien wie beispielsweise Calcium-Hydroxylapatit, Polymethylmetacrylat oder Poly-laktide unterscheiden sich grundlegend in ihren Eigenschaften und werden dementsprechend für unterschiedliche Indikationen eingesetzt (Chuang et al., 2016). Als Gerüstsubstanz für Rekonstruktionen im Gesichtsbereich eignet sich im besonderen Maße poröses

Polyethylen (PPE). PPE wird zu diesem Zweck bereits seit den 1980er Jahren verwendet (Berghaus et al., 2010).



Abbildung 2: Zweiteilige Gerüste aus PPE zur Ohrmuschelrekonstruktion.

Die Abbildung ist dem Review „Implants for reconstructive surgery of the nose and ears“ entnommen, das 2007 von Berghaus vorgelegt wurde (Berghaus, 2007).

Um die vielversprechenden Eigenschaften des PPE nutzen zu können und gleichzeitig die Risiken von Extrusion, Infektion oder Abstoßung zu minimieren, wurde in zahlreichen Studien versucht, die Implantate durch „Tissue Engineering“ gezielt zu modifizieren und für den spezifischen Zweck zu optimieren (Später et al., 2021). Der Begriff Tissue Engineering wurde 1988 durch Skalak und Fox als „Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Lebenswissenschaften mit dem Ziel fundierte Kenntnisse über Struktur-Funktions-Zusammenhänge in normalen und pathologisch veränderten Geweben zu erlangen und biologische Ersatzstoffe zu entwickeln, die darauf abzielen, Gewebefunktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern“ (Heineken and Skalak, 1991), definiert.

Durch die Veränderung der Implantat-Oberfläche, die Aussaat von Zellen in den Implantatkörper, die Etablierung vaskulärer Netze im Implantat vor Implantation, die sich mit den Blutgefäßen des Implantatlagers verbinden (Inoskulation) oder den lokalen Einsatz von Wachstumsfaktoren und Zytokinen können zentrale Parameter der Biomaterialintegration beeinflusst werden (Ehrmantraut et al., 2010, Laschke and Menger, 2016b, Laschke et al., 2008, Reichel et al., 2015, Strieth, 2013).

Zielpunkt der meisten dieser Ansätze ist dabei die Optimierung der Neoangiogenese im Implantatkörper, um eine verbesserte Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten (Sarker et al., 2015). Einzelne Autoren stellen dagegen immunologische Prozesse als zentrale Schlüsselstelle zur positiven Beeinflussung der Implantatintegration heraus (Julier et al., 2017).

Gleichwohl muss kritisch hinterfragt werden, warum nur sehr wenige dieser Ansätze bislang den Weg in die klinische Praxis gefunden haben (Williams, 2019). Eine unbequeme Antwort hierauf ist, dass der Prozess der Biomaterialintegration hinsichtlich der Rolle, die unmittelbar und mittelbar einwirkende Faktoren und Prozesse darin einnehmen, ausgesprochen komplex und in Teilen unverstanden ist (Aamodt and Grainger, 2016).

Unterschiedlichen Studien zeigen für das matricelluläre Protein Thrombospondin-1 (TSP-1) eine Beeinflussung der Angiogenese, die Modulation von Inflammation und eine Beeinflussung der extrazellulären Matrix (Rosini et al., 2018, Zhao et al., 2018).

TSP-1 weist damit Eigenschaften auf, die eine relevante Funktion des Proteins im Prozess der Biomaterialintegration nahelegen. Ziel meiner Promotion ist es, die Rolle von TSP-1 im Prozess der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten zu beleuchten. Die hierzu durchgeführten Experimente fanden auf Basis eines Kooperationsprojektes zwischen dem Labor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz und dem Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin Mainz statt.

Hierzu wird im Modell der transparenten Rückenhautkammer (DSC) untersucht, inwieweit sich die Abwesenheit des Proteins in Knockout-Mäusen (K.O.-Mäusen) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf die Vaskularisation, die Leukozytenaktivität, das Auftreten thromboembolischer Ereignisse und die mechanische Verankerung des Implantates im Implantatlager auswirkt. Zudem wird im Hen's egg test on chorioallantoic membrane (CAM Assay) der Einfluss einer Oberflächenmodifizierung von PPE-Implantaten mit TSP-1 auf die Neoangiogenese und vaskuläre Implantatintegration untersucht.

4 Literaturdiskussion

4.1 Poröses Polyethylen in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie

Polyethylen, dessen industriell reproduzierbare Synthese durch den Briten Michael Willcox Perrin 1935 entdeckt wurde, wurde bereits in den 1940er Jahren chirurgisch verwendet (Ingraham et al., 1947). So schreibt Rubin 1948, dass die Beobachtungen, dass menschliches Gewebe nur äußerst gering auf Polyethylen reagiere, dazu geführt habe, dass das Material häufig im Rahmen von Gesichtsrekonstruktion Einsatz finde (Rubin et al., 1948).

PPE wird durch Sinterung aus High-Density Polyethylen gewonnen und zeichnet sich neben seiner Elastizität durch seine im Vergleich zu porösen Metallen hohe chemische Resistenz aus (Berghaus, 1988). Weiter weisen PPE-Implantate eine hohe Formstabilität bei gleichzeitiger Verformbarkeit auf, was eine individuelle Anpassung ermöglicht. Die Materialverträglichkeit wird als gut beschrieben (Strieth, 2013). Ferner kann chirurgisches Nahtmaterial direkt durch das PPE genäht werden, sodass eine direkte Adaptation des umgebenden Gewebes an das Implantat erreicht werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die vergleichsweise kostengünstige Herstellung (Chalasanani et al., 2007).

Dreidimensionale PPE-Implantate finden in einem breiten Indikationsspektrum Verwendung. So werden diese etwa zu Orbitabodenrekonstruktionen (Song et al., 2016), Ohrmuschelrekonstruktionen (Ali et al., 2017), Augmentationen des Gesichtschädels (Gosau et al., 2006), Rekonstruktionen der Orbita nach Enukektion (Jung et al., 2012) oder auch Kranioplastiken nach Entlastungskraniektomie (Kim et al., 2018) eingesetzt. Gleichwohl ist der Einsatz bei der Rhinoplastik und rekonstruktiven Nasenchirurgie sowie in vorgeschädigten, schlecht durchbluteten Geweben problematisch (Reichel et al., 2015, Strieth, 2013, Stelter et al., 2007).

Die Größe der Poren von 100 bis 200µm hat sich für das Einwachsen fibröses Bindegewebes (Yaremchuk, 2003) und von Blutgefäßen (Strieth, 2013) als optimal erwiesen. Dies ist Grundlage der mechanischen Verankerung im umgebenden Gewebe (Sabini et al., 2000).

Die Komplikationsraten beim Einsatz von PPE-Implantaten variieren je nach Quelle und Indikation stark zwischen etwa 5 bis zu 20%. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, ob ein nicht zufriedenstellendes ästhetisches Ergebnis als Komplikation gewertet wird (Ridwan-Pramana et al., 2015, Kim et al., 2018, Niechajev, 2012, Gosau et al., 2006, Jung et al., 2012, Yaremchuk, 2003). Das Infektionsrisiko wird autorenübergreifend als gering beschrieben. So ist einem von Yaremchuk vorgelegten retrospektiven Review zu entnehmen, dass in einem Kollektiv von 162 mit PPE-Implantaten versorgten Patienten weniger als 10 % operativ revidiert werden mussten. In nur 4 Fällen musste die Revisionsoperation aufgrund einer Implantatinfektion vorgenommen werden (Yaremchuk, 2003). Kapselbildung und Kapselfibrose wie sie etwa bei Implantaten aus Silikon auftreten, wurden bei PPE-Implantaten nicht beobachtet (Gosau et al., 2006). Wohl aber berichten Gosau und Draenert über mehrkernige Riesenzellen an in Revisionsoperationen entfernten Implantaten, die als typisches histologisches Korrelat einer Fremdkörperreaktion auftreten (Gosau et al., 2008). Trotz der Einschätzung als sichere und etablierte

Prozedur, gelingt die Rekonstruktion kraniofazialer Gewebsdefekte durch dauerhafte Integration des Implantates in das umliegende Gewebe nicht oder nur unzureichend in bis zu 10 Prozent der Fälle (Niechajev, 2012). Gerade bei der Rekonstruktion malignombedingter Deformitäten kann eine erschwerte bildgebende Diagnostik in Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie sich mitunter nachteilig auf die Erkennung von Rezidiven auswirken (Gosau et al., 2006).

Trotz der genannten Einschränkungen ist der Einsatz von PPE über Jahrzehnte in der plastisch rekonstruktiven Chirurgie etabliert und PPE-Implantate sind als Medizinprodukt in der Europäischen Union zugelassen, was den Stellenwert in der klinischen Praxis unterstreicht (Malard et al., 2007, Paxton et al., 2019).

4.2 Biomaterialintegration

Der Begriff Biomaterial beschreibt entsprechend der 1999 von Williams vorgelegten Definition „ein auf die Verbindung mit biologischen Systemen ausgerichtetes Material zur Beurteilung, Behandlung, Augmentation oder zum Ersatz von Geweben, Organen oder Funktionen des Körpers“ (Williams, 2009). Major et al. subsumieren unter den Begriff auch ausdrücklich in diesem Kontext verwendete synthetische Polymere (Major et al., 2015). Biomaterialintegration beschreibt nun das Einfügen eines Biomaterials in den Wirtsorganismus und die damit verbundene Übernahme struktureller und funktioneller Aufgaben am Implantationsort (Selders et al., 2017).

Zwar sind die grundlegenden Mechanismen der Biomaterialintegration identifiziert, der Stellenwert von Einzelprozessen ebenso wie die Vernetzung ebendieser wird jedoch heute verschieden gewichtet und eingeordnet. Hannan et al. verfolgen den Ansatz, die Reaktion des Körpers auf eingebrachtes Fremdmaterial als modifizierten Prozess der Wundheilung aufzufassen. Inflammation, Hämostase, Zellproliferation und Remodellierung stehen dabei in engem Wechselspiel (Hannan et al., 2017) und der orchestrierte Ablauf dieser Prozesse ist maßgeblich und entscheidend für das Gelingen der Gewebeintegration des Fremdmaterials. Überschießende, dysregulierte Prozesse können dagegen in einer Implantatabstoßung resultieren (Morais et al., 2010).

Zunächst soll an dieser Stelle auf die Bedeutung des Immunsystems für die Biomaterialintegration eingegangen werden. Das Immunsystem höherer Vertebraten weist zwei Komponenten auf, die aufeinander aufbauen und sich ergänzen: das angeborene und das spezifische Immunsystem. Das angeborene Immunsystem setzt sich aus einer zellulären Komponente und dem aus mehreren Proteinen bestehenden Komplementsystem zusammen. Die zelluläre Komponente setzt sich aus Makrophagen, dendritischen Zellen sowie neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und basophilen Granulozyten zusammen, die wesentlichen Abwehrmechanismen sind Phagozytose und die Freisetzung zytotoxischer Substanzen. Die humorale Komponente, das Komplementsystem, zeichnet sich durch eine kaskadenartige Aktivierung des sogenannten Membranangriffskomplexes aus, der zur Porenbildung in den Biomembranen von Erregern führt und diese damit eliminiert.

Das spezifische Immunsystem wiederum besteht aus T- und B- Lymphozyten sowie aus den natürlichen Killerzellen. Es ist in der Lage, spezifische Oberflächenstrukturen zu erkennen und so eine zielgerichtete zelluläre Antwort einzuleiten, die letztlich in der Synthese spezifischer Antikörper resultiert. Ferner ist das spezifische Immunsystem Organ des „Immungedächtnisses“, welches eine zielgerichtete Immunantwort auf bekannte Oberflächenstrukturen auch mit großer Latenz nach dem initialen Kontakt vermittelt (Heinrich et al., 2014, Müller-Esterl, 2017, Nicholson, 2016). Diese Funktion des spezifischen Immunsystems macht man sich beispielsweise bei der Impfung zunutze (Ada, 1990).

Die Interaktion zwischen Immunsystem und Biomaterial hängt von der Immunogenität des eingebrachten Biomaterials sowie von den spezifischen Eigenschaften des Wirtsgewebes ab. Pattern recognition receptors (PRR) wie die Toll-like Rezeptoren (TLR) finden sich auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen (DC) oder Makrophagen und dienen der Identifikation von Gefahr-assoziierten molekularen Mustern (DAMP) und Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP). Im Kontext der Einbringung alloplastischen Fremdmaterials können die repetitiven Sequenzen langstreckiger Polymere, Oberflächenladungen, Hydrophobität aber auch bestimmte Formen über die PRR als auffällig erkannt werden und eine Aktivierung des Inflammasoms sowie des Komplementsystems eingeleitet werden (Andorko and Jewell, 2017).

Daneben bewirkt die unmittelbar nach Einbringung eines alloplastischen Fremdmaterials einsetzende Anlagerung hydrophober struktureller Proteindomänen an die zumeist hydrophoben Implantatoberflächen Konformationsänderungen der angelagerten Proteine. Die Konformationsänderungen können konsekutiv mit der Freilegung im physiologischen Zustand verborgener Epitope einhergehen. Die freigelegten Epitope weisen wiederum selbst eine erhöhte Immunogenität und Thrombogenität auf (Tang et al., 2008). Die Aktivierung des Inflammasoms führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-18 (IL-18). Daneben findet zeitlich verzögert eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems statt, die die T-Zell-Reifung in zytotoxische T-Zellen beinhaltet und über B-Lymphozyten die Bildung von Antikörpern anstößt (Andorko and Jewell, 2017).

Unmittelbar mit Implantateinbringung und dem damit verbundenen Gewebeschaden finden sich neutrophile Granulozyten und andere Zellen des angeborenen Immunsystems im Implantatlager ein. Über Chemokine-vermittelt kommt es zur Rekrutierung von Makrophagen. Initial weisen die Makrophagen einen inflammatorischen Phänotyp, der als M1 bezeichnet wird, auf. Dieser Phänotyp ist gekennzeichnet durch die Phagozytose beschädigter Zellen sowie die Produktion proinflammatorischer Faktoren wie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-12 (IL-12). Nach zwei bis drei Tagen ändert sich der Phänotyp der Makrophagen und wird als M2 bezeichnet. Den M2-Phänotyp kennzeichnen erhöhte Expressionsraten von an der Wundheilung beteiligten Genen, die Sezernierung von zellproliferationsfördernden Zytokinen und Wachstumsfaktoren und das verstärkte Einwirken der Makrophagen auf die extrazelluläre Matrix (ECM) (Mosser and Edwards, 2008, Spiller et al., 2015).

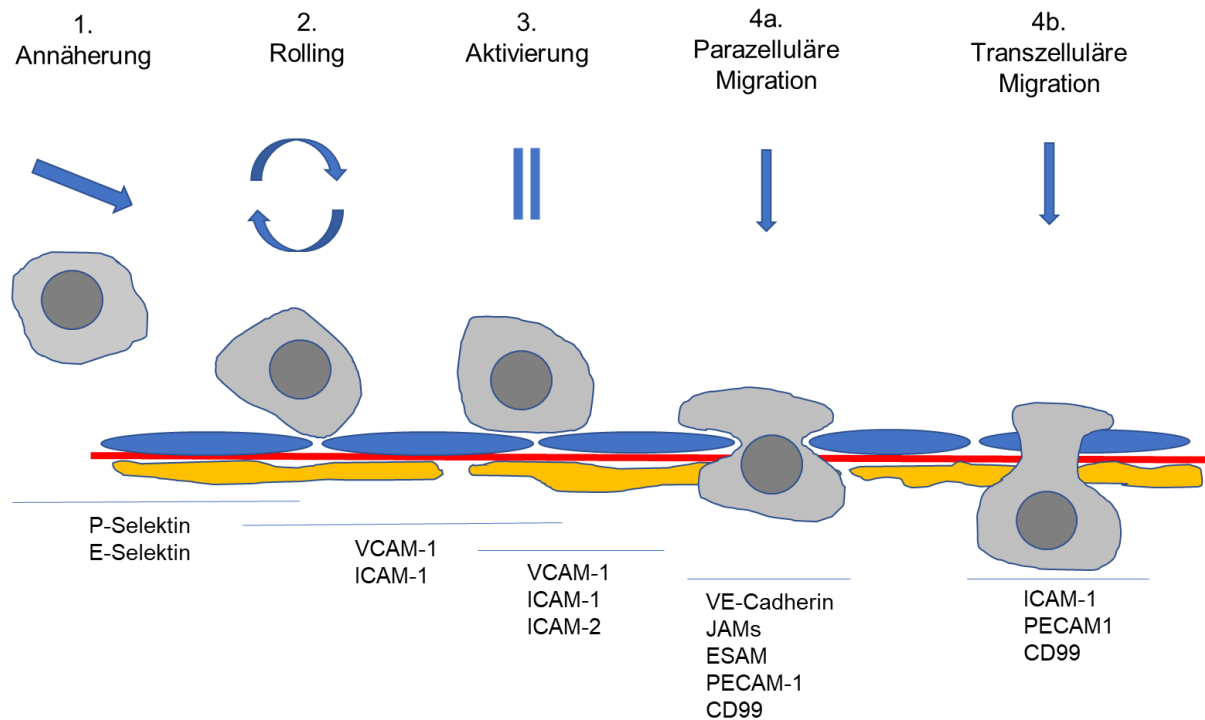


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Leukozytenextravasation.

Schematische Darstellung des Ablaufs der Leukozytenextravasation angelehnt an Filippi, 2019 und Herter und Zarbock, 2013. Längsschnitt durch eine postkapilläre Venole. Der Leukozyt ist grau, die Endothelzellen (EC) blau, die Perizyten gelb und die Basalmembran rot markiert. 1.) Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel wird durch Selektine und deren Rezeptoren vermittelt. Hierbei nimmt das durch Thrombozyten und Erythrozyten exprimierte P-Selektin eine zentrale Funktion ein. 2.) E-Selektin, das sich an der Oberfläche der EC befindet, vermittelt zusätzlich das Rollen des Leukozyten an der Gefäßwand. 3.) Über Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) und Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) kommt es zur Abbremsung des rollenden Leukozyten. Leukozyten können über zwei Wege die endotheliale Barriere durchbrechen: die parazelluläre Migration und die transzelluläre Migration. 4a.) Die parazelluläre Migration stellt dabei mit 70 – 90% den häufigeren Durchtrittsweg dar und wird durch Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM-2) initiiert. Die aus adherens junctions (Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin)) und tight junctions (Junctional Adhesion Molecules (JAM-A, -B und -C) sowie Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)) bestehenden engen Verbindungen benachbarter Endothelzellen (EC) werden geöffnet und der Leukozyt bildet Integrin-vermittelt Pseudopodien aus. Intraleukozytär kommt es zu Umstrukturierungen des Zytoskeletts, die ein Durchstülpen des Leukozyten durch das Endothel ermöglichen. Anschließend wird die endotheliale Integrität wiederhergestellt. 4b.) Die transzelluläre Migration dagegen beinhaltet die Bildung einer kanalartigen Struktur innerhalb der EC, die wahrscheinlich durch die Fusion leukozytärer und endothelialer Membranen entsteht. Hierbei bleiben die zwischen den Endothelzellen bestehenden Verbindungen intakt.

In beiden Migrationswegen sind zudem Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) und Cluster of differentiation 99 (CD99) involviert. Die Überwindung der perivaskulären Basalmembran (rot) stellt den letzten Schritt der Extravasation dar (Filippi, 2019, Herter and Zarbock, 2013, Liegsalz-Beck, 2016).

Integrität, Materialeigenschaften und Funktionalität des Implantates können durch die ausgelöste akute sterile Entzündungsreaktion vom Fremdkörpertyp maßgeblich beeinflusst werden (Anderson et al., 2008). Auch Vaskularisation und Gewebeumbau werden maßgeblich durch die Immunreaktion beeinflusst. Überschießende und chronische Entzündungsprozesse können zur Implantat-Extrusion führen oder in einer fibrotischen Verkapselung resultieren, die eine suffiziente Integration des Biomaterials in das Wirtsgewebe verhindert (Mariani et al., 2019, Morais et al., 2010).

In der Literatur werden Schlüsselstellen des Integrationsprozesses auf inflammatorischer Ebene unterschiedlich gewichtet. So fokussieren sich beispielsweise Selders et al. auf die Rolle der neutrophilen Granulozyten, da sie diesen eine zentrale Rolle in der Einleitung und Amplifikation der Entzündungsreaktion zuweisen (Selders et al., 2017). Auch die Fähigkeit zur Umstrukturierung der ECM durch neutrophile Granulozyten wird als Ansatzpunkt zur Biomaterialoptimierung diskutiert (Fetz et al., 2021). Wie oben ausgeführt nehmen Makrophagen ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Immunreaktion auf implantierte Biomaterialien, bei der Gewebeintegration dieser und bei der Gewebereparatur ein (Kzhyshkowska et al., 2015). Strategien zur Optimierung der Biomaterialintegrationen richten sich gezielt auf die Modulation des Übergangs vom M1- zum M2-Phänotyp der Makrophagen, um einen kontrollierten Übergang vom Entzündungsstadium zum Heilungsstadium zu erreichen (Barbosa and Vasconcelos, 2020, Moore and West, 2019, Spiller et al., 2014, Zhu et al., 2020).

Die Tendenz, immunsuppressive Strategien zugunsten immuninteraktiver Strategien zur Optimierung der Biomaterialintegration zu verlassen, wird in einem Review von 2019 von Vasconcelos et al. ausführlich dargelegt. Diese Adjustierung der Herangehensweise trägt der zentralen Bedeutung des Immunsystems für die strukturelle und funktionelle Gewebeheilung Rechnung. Konkret beschreiben die Autoren ausführlich die Rolle des Inflammasoms in der initialen Immunantwort auf die Fremdkörpereinbringung und sehen in der Modulation der Aktivität des Inflammasoms großes Potenzial für das Tissue Engineering (Vasconcelos et al., 2019).

Eng mit der Immunreaktion verknüpft ist der Prozess der Remodellierung, unter den die strukturelle Neuorganisation oder Erneuerung von Geweben subsummiert wird. Physiologisch wird die Remodellierung zum einen systemisch über endogene Hormonsignale aber auch über parakrine und autokrine Signalwege angestoßen (Pinet and McLaughlin, 2019). Integraler Bestandteil der Remodellierung sind Auf- und Abbauprozesse der ECM, wobei insbesondere Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine Schlüsselrolle einnehmen (Freitas-Rodriguez et al., 2017). Die Veränderungen der ECM stoßen intrazelluläre Prozesse an, die das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung, die Zellbeweglichkeit und den Zellzyklus beeinflussen (Lorda-Diez et al., 2015). Über Rückkopplungsschleifen beeinflussen diese angestoßenen Prozesse wiederum selbst die ECM. Auf Gewebeebene resultieren aus den Veränderungen auf Zellebene letztlich die alternierenden Gewebeeigenschaften (Song and Dityatev, 2018).

Bei porösen Implantaten wird eine suffiziente Gewebeintegration nicht allein durch einen Einschluss des Implantates in das Gewebe erreicht. Vielmehr ist ein ergänzendes Einwachsen des Wirtsgewebes in die Poren des Implantatkörpers

notwendig. Das Anwachsen von Bindegewebszellen auf der Implantatoberfläche ist hierfür eine Grundvoraussetzung (Soparkar et al., 2000).

Fibroblasten als prädominante Zellpopulation des Bindegewebes werden folglich ebenfalls als aussichtsreicher Ansatzpunkt zur Modulation der Biomaterialintegration angesehen. Hannan et al. betonen in einem 2017 erschienenem Review die Heterogenität der Fibroblasten und unterstreichen deren Relevanz bei der Remodellierung von Geweben. Die modulierte Reaktion des Zelltypus wird folglich als grundlegend für die langfristige Implantatfunktionalität und die Regeneration der angrenzenden Gewebe angesehen (Hannan et al., 2017).

In den letzten Jahren zeigten sich zunehmend Hinweise dafür, dass neben Immunreaktion, Remodellierung und der Neubildung von Blutgefäßen auch dem Gerinnungssystem eine zentrale Rolle bei der Biomaterialintegration zukommt.

Hämostase beschreibt den Prozess der körpereigenen Unterbindung von Blutungen. Man unterscheidet zwischen der primären Hämostase und der sekundären Hämostase. Die primäre Hämostase umfasst die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen, die Freisetzung aggregationsfördernder und gefäßverengender Mediatoren wie Thromboxan und schließlich die Thrombozytenaggregation. Im Prozess der sekundären Hämostase vermitteln Serinproteasen die Quervernetzung von Fibrinpolymeren, wodurch sich der mit Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten durchsetzte rote Abscheidungsthrampus bildet (Versteeg et al., 2013, Brandes et al., 2019).

Alloplastische Implantate weisen aufgrund zumeist negativer Oberflächenladungen und dem Fehlen antithrombotischer Mechanismen wie etwa der endothelvermittelten Stickstoffmonoxid(NO)-abhängigen Thrombozytenadhäsions- und Thrombozytenaggregationshemmung eine erhöhte Thrombogenität auf (Gbyli et al., 2018). Neben der Thrombozytenaggregationshemmung vermittelt NO endothelial auch Vasodilatation und eine Hemmung der Proliferation der Gefäßmuskulatur (Gresele et al., 2019).

Mit der Hämostase verwoben und dieser entgegengesetzt ist der Prozess der Fibrinolyse, durch den Blutgerinnsel aufgelöst werden. Mechanistisch zentral ist dabei die Bildung von Plasmin aus Plasminogen, welche durch die Plasminogen-Aktivatoren tissue-type Plasminogenaktivator (tPa) und auch Urokinase (uPa) vermittelt wird.

Die Serinprotease Plasmin besitzt eine hohe Affinität zu Fibrin, spaltet aber auch gerinnungsfördernde Faktoren wie Fibrinogen, Prothrombin und einzelne Gerinnungsfaktoren wie unter anderem Faktor V. Somit bewirkt Plasmin nicht nur die Auflösung bereits organisierter Thromben sondern auch die Herabsetzung der Koagulabilität des Blutes (Chapin and Hajjar, 2015, Longstaff and Kolev, 2015).

Die zentralen Effektoren der Fibrinolyse weisen abseits ihrer Funktion im Prozess der Fibrinolyse Eigenschaften auf, die eine Relevanz für die Biomaterialintegration andeuten.

So beleuchten die Experimente von Busuttill et al. die Bedeutung von endogenem Plasminogen und Fibrinogen für die Leukozytenrekrutierung und Leukozytenadhärenz im Kontext der Einbringung von alloplastischem Fremdmaterial. An Plasminogen-defizienten Mäusen, in deren Peritoneum Scheiben aus Polyethylen-Terephthalat

eingebraucht wurden, zeigte sich, dass die Abwesenheit von Plasminogen die Rekrutierung von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das anliegende Gewebe beeinträchtigt, während kein Einfluss auf die Leukozytenadhärenz dieser Zellen an die Implantate beobachtet wurde. In Fibrinogen-defizienten Mäusen wiederum war die Adhärenz eingeschränkt, während keine Beeinträchtigung der Leukozytenrekrutierung im anliegenden Gewebe nachgewiesen wurde (Busuttil et al., 2004).

Plasmin, das Schlüsselenzym der Fibrinolyse, wirkt über die Aktivierung unterschiedlicher MMPs auf die ECM und über die Spaltung von Laminin, Fibronectin und Thrombospondin vermittelt auch auf die endotheliale Basalmembran ein (Aisina and Mukhametova, 2014, Deryugina and Quigley, 2012).

Die Plasmin-Aktivatoren tPA und uPA werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen exprimiert und beeinflussen die Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen (Brodsky et al., 2001, Deindl et al., 2003, Hao et al., 2010, Ismail et al., 2021, Mantuano et al., 2017, Stefansson and Lawrence, 2003).

Die Arbeitsgruppe um Reichel et al. entwickelte aufgrund dieser Eigenschaften die Hypothese, dass die Plasminogen-Aktivatoren Einfluss auf die Integration von Implantaten ausüben. Sie zeigten im Modell der DSC, dass endogenes uPA und tPA aber auch deren Inhibitor Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) die Bildung von Gefäßnetzwerken in PPE-Implantaten und die Kollagenablagerung im Implantatkörper fördern. Zudem kann durch eine Oberflächenbeschichtung mit uPA, tPA und PAI-1 die Vaskularisation von PPE-Implantatkörpern beschleunigt werden. Diese Beobachtung führen die Autoren auf durch uPA, tPA und PAI-1 vermittelte chemotaktische Effekte zurück, die die Einwanderung von Endothelzellen in den Implantatkörper fördern (Reichel et al., 2015).

Die Koninzens von Oberflächenbesiedlung, Zellmigration und bindegewebigem Einwachsen in die Poren poröser Implantate erfordert die Gewährleistung eines Mikromilieus, in welchem insbesondere eine suffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet ist. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Ernährung von Zellen über den Diffusionsweg limitiert ist (Folkman and Hochberg, 1973). Somit ergibt sich eine hohe Abhängigkeit des Gelingens der Biomaterialintegration von Geschwindigkeit, Quantität und Qualität des Anschlusses an das Blutgefäßsystem. Diesem Ansatz wird im folgenden Kapitel ausführlich Rechnung getragen.

4.3 Angiogenese

Die fundamentale Bedeutung der Etablierung einer suffizienten Blutversorgung im Kontext der Biomaterialintegration ergibt sich daraus, dass sich Zellen maximal über eine Diffusionsstrecke von 200µm ernähren können (Folkman and Hochberg, 1973). Folglich hängt die nachhaltige Gewebeintegration und die Funktionalität von im Rahmen des Tissue Engineering eingesetzten Gerüstsubstanzen entscheidend von deren Vaskularisation ab (Laschke and Menger, 2012). Hierbei muss zwischen verschiedenen Prozessen unterschieden werden. Die *de novo* Entstehung der initialen vaskulären Netzwerke auf der Basis von mesodermalen Vorläuferzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet. Diese mesodermalen Vorläuferzellen werden als Angioblasten bezeichnet. Die Angioblasten differenzieren zu Endothelzellen und aggregieren (Naito et al., 2020). Die Vaskulogenese findet überwiegend, aber nicht ausschließlich in der embryonalen Phase statt (Ayala-Dominguez et al., 2019). Angiogenese hingegen bezeichnet die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits vorbestehenden Blutgefäßen (Ayata et al., 2015). Hierbei wird zwischen den Prozessen des Sprouting und der Intussuszeption differenziert (Naito et al., 2020). Das Sprouting wird durch eine Aktivierung der Endothelzellen durch das Überwiegen pro-angiogener Faktoren wie beispielsweise VEGF-A infolge von Hypoxie oder von Entzündungsprozessen induziert (Germain et al., 2010, Whiteford et al., 2016). Die aktivierten Endothelzellen verlieren ihre adherence junctions und vermittelt durch MMPs findet ein lokaler Umbau der Basalmembran statt. Die Differenzierung der Endothelzellen in spezialisierte tip-Zellen und stalk-Zellen resultiert schließlich in der Aussprossung einer neuen Kapillare. Die tip-Zellen richten das Wachstum der neuen Kapillare über Filopodia nach dem Wachstumsreiz aus, während die stalk-Zellen proliferieren und das neu entstehende Lumen auskleiden (Cantelmo et al., 2017). Die Arteriogenese bezeichnet die nun stattfindende Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen. Über Proteine der ECM wird die Bildung einer neuen Basalmembran unterhalb der Endothelzellen induziert (Carmeliet and Jain, 2011).

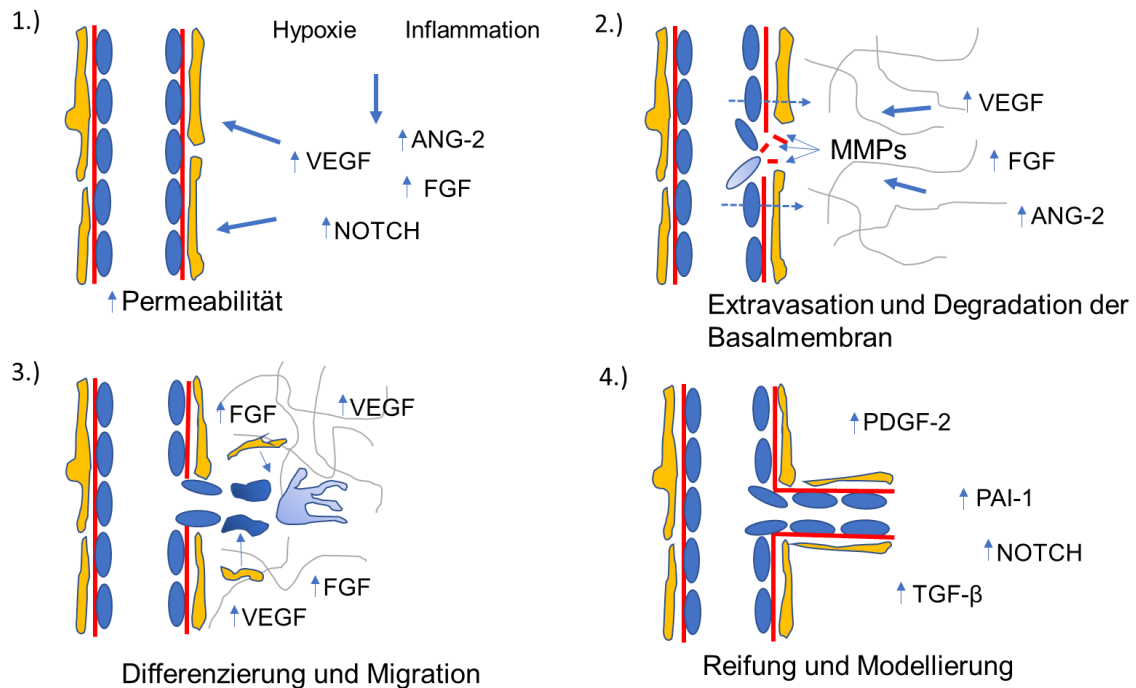


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vessel Sprouting.

Die Abbildung ist an die Grafiken von Carmeliet und Jain, 2011 sowie Hoormann, 2020 angelehnt. Längsschnitt durch eine Kapillare: in blau sind die Endothelzellen, in gelb die Perizyten und in rot ist die Basalmembran dargestellt. Für die Aufrechterhaltung des Ruhezustandes der Endothelzellen ist vor allem die autokrine Sekretion von Angiopoetin-1, Fibroblast growth factor (FGF), Notch-Liganden und Vascular endothelial growth factor (VEGF) verantwortlich. 1.) Hypoxie oder Inflammation bewirken über VEGF, FGF oder Angiopoetin-2 (ANG-2) eine Erhöhung der Permeabilität der kapillären Gefäßwand. 2.) Die Extravasation von Plasmaproteinen wie Fibrinogen und Fibronectin ermöglicht die Etablierung eines Grundgerüsts (hellgrau) für die Endothelzellmigration. Die Degradation der Basalmembran durch Matrix-Metalloproteinasen setzt weitere Wachstumsfaktoren wie insbesondere FGF und VEGF frei. Es kommt zur Selektion einer Endothelzelle, die differenziert und als sogenannte tip-Zelle (hellblau dargestellt) die Richtung der Aussprossung vorgibt. 3.) Die tip-Zelle weist Filopodien auf und folgt Wachstumssignalen (Semaphorine und Ephrine). Ihr folgen Endothelzellen, die als sogenannte stalk-Zellen proliferieren, wachsen, das neu-entstehende Gefäßlumen auskleiden und Perizyten rekrutieren. 4.) Die Reifung der neu entstandenen Kapillare, also die Ausbildung einer neuen Basalmembran, die weitere Perizyten-Rekrutierung und die Etablierung dichter endothelialer Verbindungen, wird insbesondere durch Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-I), Transforming growth factor β 1 (TGF- β), Platelet-derived growth factor B (PDGF-B) und Notch-Liganden vermittelt (Eilken and Adams, 2010, Hoormann, 2020, Ribatti and Crivellato, 2012, Carmeliet and Jain, 2011).

Im Rahmen der Intussuszeption hingegen spaltet sich ein bestehendes Gefäß auf. Die Entstehung einer intravaskulären Mikrostruktur, der sogenannten *pillar*, und die Neuordnung der vaskulären Endothelzellen bewirkt eine intraluminalen Aufteilung. Die *pillar* setzt sich maßgeblich aus endothelialen Membranen zusammen, kann manchmal aber auch Myofibroblasten und selten auch Perizyten enthalten (Mentzer and Konerding, 2014). Diese Aufteilung führt dann dazu, dass am Ende des Prozesses zwei perfundierte Gefäße stehen (George et al., 2011). Die grundlegenden biomolekularen Mechanismen der Intussuszeption sind noch weitgehend unbekannt. Gleichwohl wird eine anhaltende Zunahme der Perfusion im Ausgangsgefäß mit einhergehender Erhöhung der Scherspannung als Auslöser diskutiert (Esteban et al., 2020, Filipovic et al., 2009).

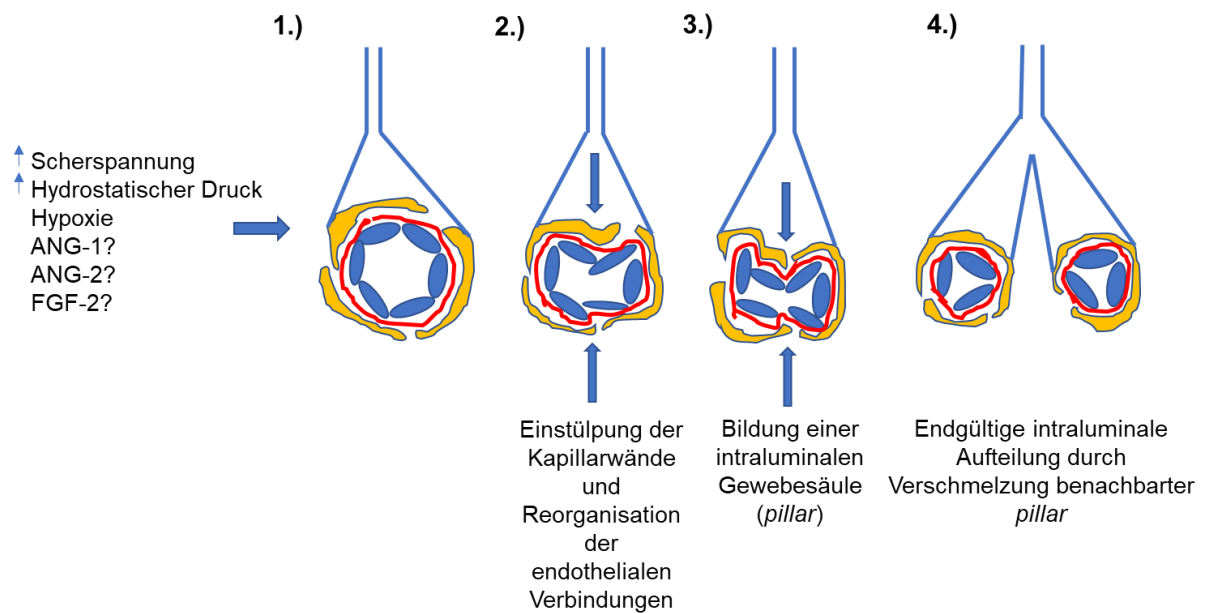


Abbildung 5: Schematische Darstellung der intussuszeptiven Angiogenese.

Die Abbildung ist angelehnt an De Spiegelaere et al., 2012 und Mentzer und Konerding, 2014. Als auslösende Signale wird neben einem Anstieg der Scherspannung und des hydrostatischen Druckes auch Hypoxie angenommen. In der Literatur wird zudem auf molekularer Ebene ein fördernder Einfluss von Basic fibroblast growth factor (FGF-2), Angiopoetin-1 (ANG-1) und Angiopoetin-2 (ANG-2) diskutiert. 1.) Ausgangssituation: Querschnitt durch eine Kapillare. Die Endothelzellen sind blau, die Basalmembran rot und die Perizyten gelb markiert. 2.) Die Kapillarwände stülpen sich nach intraluminal ein und es beginnt die Reorganisation der endothelialen Verbindungen. 3.) Es kommt zur Herausbildung einer als „pillar“ bezeichneten intraluminalen Gewebesäule, in diese werden ECM-Bestandteile eingelagert und es kommt zur optionalen Anlagerung von Perizyten und Myofibroblasten. 4.) Durch die Verschmelzung benachbarter *pillar* kommt es zur endgültigen intraluminalen Aufteilung der Kapillare, sodass am Ende des Prozesses zwei Kapillaren vorzufinden sind (Burri et al., 2004, De Spiegelaere et al., 2012, Mentzer and Konerding, 2014, Styp-Rekowska et al., 2011).

Interessanterweise zeigten Bongrazio et al. *in vivo*, dass Scherspannung sich auf die Expression von TSP-1 und des Rezeptors CD36 auswirkt. In Endothelzellfraktionen war die TSP-1 Expression herunterreguliert, während sie in Whole Muscle Zell

Homogenaten gesteigert war (Bongrazio et al., 2006). Esteban et al. berichten von einer Verknüpfung von TSP-1 mit dem Prozess der intussuszeptiven Angiogenese. Demnach werde über die Prozessierung durch die Membran Typ 1 – Matrix-Metalloproteinase (MT1-MMP), ein C-terminales TSP-1 Fragment abgespalten. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass dieses Fragment durch die Oberflächenrezeptoren CD47 und $\alpha\beta 3$ über die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine Erhöhung des NO-Spiegels vermittelt. Dies wiederum löse eine Vasodilatation aus, woran sich der oben beschriebene Umbau der Kapillaren im Rahmen der Intussuszeption anschliesse (Esteban et al., 2020).

4.4 Strategien zur Optimierung der Biomaterialintegration von Implantaten aus porösem Polyethylen

Die auf eine Optimierung der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten abzielenden Strategien lassen sich a priori in vier Ansätze unterteilen (Später et al., 2021): die Veränderung der physikochemischen und biophysischen Eigenschaften des Implantates, die Oberflächenmodifikation des Implantates mit pro-angiogen oder immunmodulatorisch aktiven Wirkstoffen, die Besiedlung des Implantates mit Zellen oder Zellverbänden und die lokale oder systemische Beeinflussung des Implantatlagers (Später et al., 2021).

Das Verfahren der Plasmaätzung beeinflusst die physikochemischen Eigenschaften des PPE-Implantates, indem es den Sauerstoffgehalt der Implantatoberfläche steigert und die Rauigkeit des Implantates erhöht. Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich die vaskuläre Integration von mittels Plasmaätzung behandelten PPE-Implantaten jedoch nachweislich negativ beeinflusst (Laschke et al., 2016). Die Verbindung aus dem Calcium-Natrium-Phosphosilikat Bioglass 45S5 und PPE ist seit 2002 durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) unter dem Namen Medpor® PLUS™ (MP+) zugelassen. MP+ stellt laut Später et al. bisher den einzigen Ansatz zur Steigerung der Vaskularisation von PPE-Implantaten dar, der den Sprung in die klinische Praxis geschafft hat (Später et al., 2021). Durch das Hinzufügen von Bioglass 45S5 verändern sich zentrale Materialeigenschaften der Implantate: Elastizitätskoeffizient und Mikrohärtigkeit der Implantate steigen an, während Zugfestigkeit und Bruchdehnung abnehmen. Somit sind MP+-Implantate steifer und härter als PPE-Implantate, weisen dabei aber eine geringere Reißfestigkeit und eine geringere Verformbarkeit als diese auf (Wang et al., 1998).

Zur fibrovaskulären Integration von MP+-Implantaten liegen nur wenige Studien vor. Eine Überlegenheit gegenüber konventionellen PPE-Implantaten wird in einer prospektiven randomisierten Studie von Naik et al. beschrieben. An einem Patientenkollektiv von 10 ProbandInnen, die nach Eukleation entweder mit MP+ oder PPE-Implantaten versorgt wurden, zeigte sich in magnetresonanztomographischen Kontrollen der mittlere vaskularisierte Bereich pro Implantat in der MP+-Gruppe größer (Naik et al., 2007, Später et al., 2021).

Eine Modifikation der Implantatoberfläche mit der Aminosäure Arginin zeigte sich *in vitro* einer Behandlung mit Gold-Nanopartikeln hinsichtlich der Anlagerung von Zellen an die Implantatoberfläche überlegen. Dieser Effekt wird auf eine durch das Arginin

hervorgerufene Steigerung der Hydrophilität der PPE-Implantate zurückgeführt und veranschaulicht die Relevanz biophysischer Faktoren (Sengupta et al., 2018).

Ebenfalls auf eine Verbesserung der Implantat-Zelladhäsion zielt die Modifikation der PPE-Implantate mit der ungesättigten Carbonsäure Acrylsäure (AA) alleine oder in Kombination mit Arginylglycylasparaginsäure (RGD) ab. RGD ist ein Peptidmotiv der ECM, über das die Bindung von Integrinen vermittelt wird (Plow et al., 2000). Park et al. implantierten Hasen sphärische PPE-Implantate, die entweder unbehandelt blieben, singular mit AA oder kombiniert mit AA und PGD modifiziert wurden, in die abdominale Muskulatur. Die Studie zeigt, dass sich durch die Modifizierung mit AA alleine aber deutlicher noch durch die Kombination von AA und RGD die fibrovaskuläre Integration der Implantate 14 und 28 Tage postoperativ verbessern lässt. Die gegen das Implantat gerichteten Fremdkörperreaktion zeigt sich sowohl durch die singuläre Modifikation mit AA als auch durch die kombinierte Modifikation mit AA und RGD abgeschwächt (Park et al., 2007).

Auch durch die Modifikation der Implantoberfläche mit anorganischen Substanzen wie Calciumsulfat-Hydroxyapatit kann ein integrationsfördernder Effekt erzielt werden. Durch die Oberflächenbeschichtung lagern sich *in vitro* vermehrt mesenchymale Stammzellen an und zeigen einen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Proliferationsgrad (Fouad et al., 2018).

Einen beleuchtenswerten Aspekt stellen synergistische Effekte von Wachstumsfaktoren mit anorganischen Substanzen dar. Gérard et al. zeigen, dass die Besiedlung dreidimensionaler tubulärer Kollagengerüste mit endothelialen Zellen *in vivo* durch die Kombination von Kupfersulfat und Basic fibroblast growth factor (FGF-2) dosisabhängig stärker gefördert wird gegenüber einer alleinigen Beschichtung mit FGF-2 (Gerard et al., 2010).

Neben der biophysischen Modifikation wurden diverse Wirkstoffe hinsichtlich ihres Einflusses auf die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten untersucht. So zeigen Hussain et al. in der DSC, dass eine Umhüllung der PPE-Implantate mit Tumornekrosefaktor- α (Etanercept) kombiniert mit Komponenten der ECM die initiale Entzündungsreaktion abmildert und die fvd im Implantat erhöht (Hussain et al., 2021).

Interessanterweise zeigt sich durch eine Umhüllung der Implantate mit in wachstumsfaktorreduziertem Matrigel (GRF Matrigel) angereichertem VEGF ebenfalls eine Abschwächung der Entzündungsreaktion in der DSC. Diese Abschwächung der Entzündungsreaktion manifestiert sich durch eine in der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Leukozyten-Endothelinteraktion an Beobachtungstag 7 nach Implantateinbringung. GRF Matrigel ist ein ECM-basiertes Hydrogel (Kleinman and Martin, 2005). Eine positive Beeinflussung der vaskulären Parameter konnte gegenüber einer ausschließlich mit GRF Matrigel umhüllten und einer unbehandelten Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden. Zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich in der Messung der dynamischen Desintegrationskraft keine signifikanten Unterschiede. Allerdings wird die Tendenz beschrieben, dass in der mit GFR Matrigel und VEGF umhüllten Versuchsgruppe mehr Kraft zur Implantatluxation aufzubringen ist, was auf eine erhöhte mechanische Verankerung im Implantatlager hinweist (Strieth et al., 2010).

Wie im Kapitel "Biomaterialintegration" bereits kurz beleuchtet, zeigt sich in K.O.-Mäusen die fibrovaskuläre Integration von PPE-Implantaten in Abwesenheit der

Plasmin-Aktivatoren uPA und tPA sowie deren Inhibitor PAI-I beeinträchtigt. Ferner fördert eine Oberflächenbeschichtung mit den genannten Proteinen die Biomaterialintegration der PPE-Implantate im Wildtyp (Reichel et al., 2015). Das matrizelluläre Glykoprotein Vitronectin (VN) bewirkte als Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten im Wildtyp ebenfalls eine Steigerung der fibrovaskulären Integration. Zusätzlich zeigte sich in VN K.O.-Mäusen eine signifikante Beeinträchtigung der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten. Im Proteomic Profiling der Implantate zeigte sich quantitativ im Hinblick auf pro-angiogene Modulatoren keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Daraus wird geschlossen, dass der Aktivierungsgrad einzelner Wachstumsfaktoren für deren Wirkungsentfaltung relevanter ist als die rein quantitative Konzentration (Hessenauer et al., 2018).

Wachstumsfaktoren wirken zeitlich und räumlich abgestimmt auf Gewebe und deren Gefäßnetzwerke. Daher muss pharmakokinetischen Eigenschaften im Tissue Engineering Rechnung getragen werden (Chu and Wang, 2012, Saltzman and Olbricht, 2002). Eine konzertierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren über sogenannte Drug-Delivery-Systeme (DDS) ermöglicht eine Beeinflussung der Freisetzungskinetik, der örtlichen Verteilung von Wirkstoffen und der Kontextabhängigkeit der Wirkstofffreisetzung (Tabata, 2000, Zhang et al., 2018). Neben chemischer Modifikation oder der Verwendung von Hydroelen können Albumin Nanopartikel (AN) als DDS fungieren. In der DSC konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von AN eine verzögerte Freisetzung von niedermolekularen Wirkstoffen in PPE-Implantaten möglich ist (Eckrich et al., 2021b).

Die Aussaat von Zellen oder Zellpartikeln auf die Implantatoberfläche stellt eine weitere Strategie der Implantatoptimierung dar. Sabini et al. zeigten an Sprague-Dawley-Ratten, dass das Einbringen eines autologen Blut-Koagels die Kollagenablagerung im Implantatkörper und die Besiedlung des Implantatkörpers mit Fibroblasten im Vergleich zur Modifizierung mit FGF-2 sowie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe begünstigt (Sabini et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe um Scalafani untersuchte an Kaninchen die Implantatmodifikation von PPE-Implantaten und von Acellular Dermal Grafts (ADG) jeweils mit autologen Blut-Koageln, autologem Thrombozytenkonzentrat und Blutplasma (Platelet-Poor Plasma (PPP)). Es zeigte sich, dass autologe Thrombozytenkonzentrate in den ersten 7 Tagen nach Implantation die Prozesse der Wundheilung und der Fibrovaskularisation sowohl in den PPE-Implantaten als auch in den ADG begünstigten. Dagegen zeigten sich durch eine Behandlung mit PPP und autologen Blut-Koageln keine Effekte (Scalafani et al., 2005).

Hussain et al. nutzten mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markierte dermale Fibroblasten zur *in vitro* Besiedlung von PPE-Implantaten, bevor diese in Wildtyp-Mäuse implantiert wurden. Es zeigte sich durch die Zellaussaat keine Verbesserung der Biokompatibilität der Implantate in der DSC gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe. Nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen konnten weiterhin ca. 70 % der Fibroblasten fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden, zudem zeigten sich die Konzentrationen von Interleukin-2, Interleukin-17A sowie Interleukin-10 in der Versuchsgruppe erhöht. Die vaskulären Parameter zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf (Hussain et al., 2016).

Ehrmantraut et al. zeigten ebenfalls in der DSC, dass eine kombinierte Oberflächenmodifizierung aus thrombozytenreichem Blutplasma (PRP) und humanen Chondrozyten einer Beschichtung ausschließlich mit PRP im Hinblick auf die Erhöhung der fvd überlegen ist (Ehrmantraut et al., 2012).

Die Verwendung von in 30% Hydrogel gelösten Chondrozyten zur Umhüllung von PPE-Implantaten einerseits und Wire-Mesh-Implantaten aus 24-karätigem Gold andererseits wurde von der Arbeitsgruppe um Monroy *in vivo* in immunkompetenten Schweinen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen untersucht. Hierbei wurde 10 Wochen nach Implantation das bedeckende Hautgewebe eröffnet zur Simulation der Implantat-Extrusion. Es schloss sich eine Phase sekundärer Wundheilung an, in dieser zeigte sich in den behandelten Versuchsgruppen bereits nach 7 Tagen ein Wundverschluss, der in den korrespondierenden Kontrollgruppen erst am 10. Tag beobachtet wurde. In der histologischen Aufarbeitung wiesen die behandelten Versuchsgruppen eine Umhüllung aus neu-entstandenem Knorpelgewebe auf und es zeigte sich eine geringgradige Entzündungsreaktion (Monroy et al., 2007). Die Verwendung von Chondrozyten zur Umhüllung von PPE-Implantaten erscheint unter praktischen Gesichtspunkten naheliegend, da diese einen vergleichsweise geringen metabolischen Bedarf aufweisen - sich daher bis zu einem bestimmten Grad ausschließlich über Diffusion ernähren können - und vergleichsweise resistent gegenüber metabolischem Stress sind. Diese Eigenschaften können dem bis zur Etablierung funktionsfähiger vaskulärer Netze im Implantat von Hypoxie und Mangel an Nährstoffen geprägten Mikromilieu Rechnung tragen (Später et al., 2021).

Einen über die Implantatbesiedlung mit Zellen hinausgehenden Ansatz zur Verbesserung der Implantatintegration stellt die Einbringung ganzer Zellverbände und Anteile von Gefäßnetzen in die PPE-Implantate dar. Der Anschluss eines vorbestehenden Gefäßnetzes an das Empfängergewebe wird als Inoskulation bezeichnet (Auger et al., 2013). Für PPE-Implantate gibt es bislang keine publizierten Daten zur Inoskulation. Allerdings wurde für Implantate aus Polylactid-co-Glykolyd (PLGA) beschrieben, dass diese nach erfolgter Vaskularisation entnommen werden und in isogene Tiere reimplantiert werden konnten. Im Vergleich dieser bereits vaskularisierten und isogen reimplantierten PLGA-Gerüste zur Kontrollgruppe aus unbehandelten PLGA-Gerüsten konnte in der Versuchsgruppe in der DSC signifikant früher Perfusion nachgewiesen werden. Die Autoren führen dies auf eine Reperfusion der eingebrachten vaskulären Netzwerke durch die Etablierung neuer vaskulärer Verbindungen zum Wirtsgewebe zurück (Laschke et al., 2008).

Als vielversprechende Alternative zur Verwendung strukturell intakter Gefäßnetze wird die Verwendung mikrovaskulärer Fragmente (MVF), die sich aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen zusammensetzen, beschrieben. Die MVF werden durch enzymatische Behandlung aus Fettgewebe gewonnen. Später et al. berichten, dass durch die Kombination von MVF mit PRP in PPE-Implantaten schon 3 Tage nach Implantation in die DSC perfundierte Blutgefäße im Implantat nachgewiesen werden konnten. In der unbehandelten Kontrollgruppe und einer ausschließlich mit PRP behandelten Versuchsgruppe waren perfundierte Gefäße hingegen erst nach 6 Tagen detektierbar. Da die MVF aus GFP⁺-Mäusen entnommen wurden und die Implantation in GFP⁻-Mäuse erfolgte, konnte die Beteiligung der MVF an der Etablierung neuer vaskulärer Netzwerke intravitalmikroskopisch nachvollzogen werden. Hinsichtlich der ebenfalls evaluierten Leukozyten-Endothellinteraktion traten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Allerdings zeigte sich in der mit MVF und PRP behandelten Versuchsgruppe sowie in der alleinig mit PRP behandelten Versuchsgruppe

gegenüber der Kontrolle eine Begünstigung des M2-Phänotyps in den Makrophagen im Implantatlager (Später et al., 2020).

Von den eben ausgeführten Strategien zur Optimierung der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten, die an den PPE-Implantaten ansetzen, sind Strategien abzugrenzen, die auf eine systemische Beeinflussung des Wirtsgewebes oder eine lokal begrenzte Beeinflussung des Implantatlagers abzielen.

Grundlage dieser Ansätze ist, dass neben dem Implantat auch das Wirtsgewebe entscheidenden Einfluss auf die Biomaterialintegration nimmt. Zum einen kann das Implantatlager durch die lokale Applikation von Wirkstoffen wie etwa Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. So resultierte die wiederholte, transkutane Injektionen von Epidermal growth factor oder Basic fibroblast growth factor in direkter Implantatumgebung in der Rückenmuskulatur von Kaninchen in einer gesteigerten Anreicherung von Fibroblasten im Implantatkörper gegenüber einer mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Soparkar et al., 2000). Auch durch die lokale Applikation von Macrophage-activating lipopeptid-2 (MALP-2) konnte *in vivo* die Vaskularisation von PPE-Implantaten verbessert werden (Laschke et al., 2014).

Ehrmantraut et al. zeigten, dass eine systemische perioperative Therapie mit Kortikosteroiden angiogene Prozesse im Kontext der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten beeinträchtigt, was konsekutiv mit einer schlechteren Verankerung der Implantate im Gewebe verbunden ist. Dementsprechend raten die Autoren bei Verwendung von PPE-Implantaten von einer begleitenden Therapie mit Kortikosteroiden ab (Ehrmantraut et al., 2010).

4.5 Matrizelluläre Proteine

Die Gruppe der matrizellulären Proteine umfasst der Definition von Paul Bornstein entsprechend Proteine, die in den extrazellulären Raum oder die ECM sezerniert werden, ohne dort primär strukturelle Aufgaben zu erfüllen. Ihre Funktion besteht in der Modulation zellphysiologischer Vorgänge über die Interaktion mit Rezeptoren an der Zelloberfläche, Proteasen, Hormonen und anderen biologisch aktiven Molekülen. Sie treten zudem mit den strukturellen Proteinen der ECM in Wechselwirkung (Bornstein, 1995).

Weitere Merkmale sind hohe Expressionsraten in der Embryonalphase und in der adulten Phase im Rahmen der Wundheilung und Gewebserneuerung, ein im Gegensatz zu anderen Matrixproteinen geringes Zelladhäsionsvermögen (Heinrich et al., 2014), ein eher unauffälliger Phänotyp in K.O.-Mäusen und eine starke Kontextabhängigkeit der Funktion (Bornstein, 2009). Letztere erklären sich durch das Einwirken unterschiedlicher Strukturproteine, Rezeptoren, Proteasen und Cytokine auf die matrizellulären Proteine im lokalen Umfeld der verschiedenen Gewebe (Bornstein, 2009).

Ursprünglich wurden nur TSP-1, Osteonectin (SPARC) und Tenascin C zu den matrizellulären Proteinen gezählt. Mittlerweile umfasst der Begriff neben weiteren Mitgliedern der TSP-, Osteonectin- und Tenascin-Familien auch Osteopontin, Mitglieder der CCN Protein-Familie (Cyr61, CCN2 und CCN3), Periostin, R-Spondine, Hemicentin, Galectine, kleine Proteoglycane mit leucinreichen Domänen (SLRPs),

Autotaxine, Pigment derived factor (PEDF) und PAI-1 (Murphy-Ullrich and Sage, 2014).

Matrizelluläre Proteine wurden bisher nur spärlich im Kontext des Tissue Engineering erforscht, was angesichts ihres Einflusses auf grundlegende Endothelfunktionen überrascht (Ramaswamy et al., 2019). Zumal zu einzelnen matrizellulären Proteinen tierexperimentelle Daten vorliegen, die ein großes Potenzial dieser im Einsatz als Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten nahelegen. So wurde, wie oben ausgeführt, das matrizelluläre PAI-1 neben uPA und tPA als Oberflächenbeschichtung vor dem Hintergrund seiner regulatorischen Funktion in der Fibrinolyse von Reichel et al. im Rückenhautkammermodell im Kontext der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass neben einer positiven Beeinflussung zentraler Gefäßparameter wie der funktionellen Gefäßdicke (fvd) und der Anzahl der Gefäßverzweigungen zu verschiedenen Zeitpunkten auch die Leukozytenrekrutierung beeinflusst wurde (Reichel et al., 2015). Ebenso ließ sich durch eine Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem VN die Vaskularisierung von PPE-Implantaten steigern. An VN-defizienten Mäusen konnte in der DSC ebenfalls eine Beeinflussung der Leukozytenrekrutierung im Kontext der Biomaterialintegration gezeigt werden (Hessenauer et al., 2018).

4.6 Thrombospondin-1

TSP-1 ist ein glykosyliertes homotrimeres Protein mit einer Masse von 450kDa, dessen Monomere sich aus einer kugelförmigen N- und C-Domäne, einer Präkollagen-Domäne, sowie den Thrombospondinrepeats 1, 2 und 3 zusammensetzen und die über Disulfidbrücken verbunden sind (Bonney et al., 2008, Zhang et al., 2020, Lawler and Lawler, 2012) (siehe Abbildung 6).

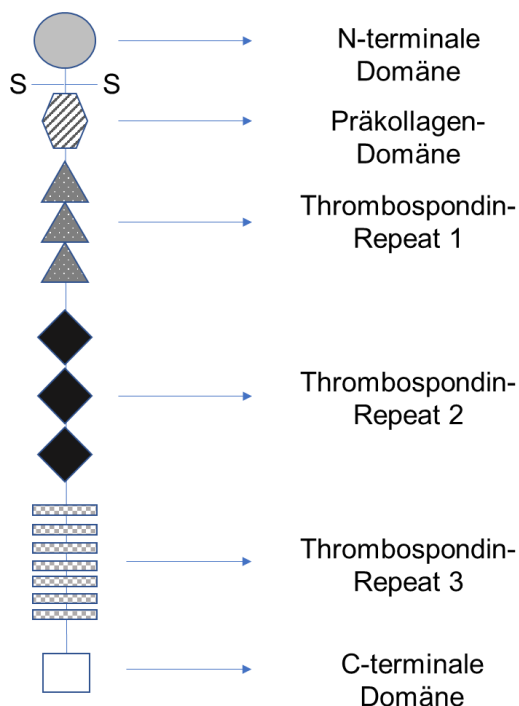


Abbildung 6: Struktur des Thrombospondin-1 Monomers.

Die Darstellung ist angelehnt an Lopez-Dee et al., 2011 und Koch, 2012. TSP-1 ist ein homotrimeres Protein, dessen Monomere über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind, die durch den Buchstaben S dargestellt sind. An die N-terminale Domäne schließt sich die Präkollagen-Domäne an. An diese wiederum reihen sich die Thrombospondin-Repeats 1, 2 und 3. Den Abschluss des TSP-1 Monomers bildet die C-terminale Domäne (Koch, 2012, Lopez-Dee et al., 2011).

TSP-1 und TSP-2 werden aufgrund des Vorliegens gleicher struktureller Domänen der Subgruppe A der Thrombospondin-Proteinfamilie zugeordnet. Die Subgruppe B setzt sich aus TSP-3, TSP-4 und dem auch als cartilage oligomeric matrix protein (COMP)

bekanntes TSP-5 zusammen (Chen et al., 2000). Die strukturelle Nähe von TSP-1 zu TSP-2 wird kontrastiert durch erhebliche Funktionsunterschiede zwischen den beiden Proteinen. So vermag es TSP-1 im Gegensatz zu TSP-2 beispielsweise Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) zu aktivieren. Diese Funktionsunterschiede erklären sich durch erhebliche Abweichungen in der Zusammensetzung der Aminosäuresequenzen der N-terminalen Domänen, welche die Bindungsfähigkeit der unterschiedlichen Liganden beeinflusst (Zhang et al., 2020).

TSP-1 wird von Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten, glatten Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen aber auch von malignen Zellen wie beispielsweise Gliomzellen sezerniert (Lopez-Dee et al., 2011). Das in den α -Granula der Thrombozyten enthaltene TSP-1 wird in den Megakaryozyten gebildet und wird infolge der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin ausgeschüttet (Bonney et al., 2008). Die Plasmaspiegel von TSP-1 befinden sich im Normalfall im Bereich von 0,1-0,2 Mikrogramm pro Milliliter, sind jedoch bei Übergewichtigen und Diabetikern signifikant erhöht (Li et al., 2013).

Lawler et al. beschrieben 1998 die Physiologie von TSP-1 K.O.-Mäusen. Diese wiesen einen weitgehend unauffälligen Phänotyp mit weitgehend normaler Morphologie und Funktion der zentralen Organe mit Ausnahme der Lunge auf, wo sich ausgeprägte akute und organisierende Pneumonien zeigten. Die Bronchialarterien waren verdickt und gewunden und wiesen eine Hyperplasie der glatten Muskelzellen auf (Crawford et al., 1998). Die Zahl der zirkulierenden Leukozyten, davon insbesondere die prozentualen Anteile der Eosinophilen und der Monozyten, war erhöht. Die Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung und die Blutungszeit erwiesen sich als unauffällig und auch die Plasma-Spiegel der anderen Thrombospondine wiesen keine reaktive Erhöhung auf (Lawler et al., 1998).

Die Einordnung der Beeinflussung der Angiogenese durch TSP-1 ist von der Dichotomie geprägt, dass zwar einzelne Studien einen angiogenesefördernden Effekt beschreiben (BenEzra et al., 1993, do Outeiro-Bernstein et al., 2002), gleichzeitig TSP-1 in der Fachliteratur jedoch überwiegend als Inhibitor der Angiogenese beschrieben wird (Nor et al., 1997, Lawler, 2002).

Inzwischen hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass über unterschiedliche TSP-1 Domänen sowohl fördernde als auch hemmende Effekte auf die Angiogenese vermittelt werden. Während beispielsweise der Thrombospondin type 1 repeat eine anti-angiogene Wirkung entfaltet, besitzt die N-terminale Domäne eine pro-angiogene Aktivität (Ochoa et al., 2010). Zudem finden sich Autoren, die die Beeinflussung der Angiogenese durch TSP-1 feingliedrig im Hinblick auf einzelne angiogenetische Prozesse beleuchten. So messen beispielsweise Esteban et al. TSP-1 wie oben ausgeführt eine fördernde Rolle im Rahmen der intussuszeptiven Angiogenese zu (Esteban et al., 2020).

Als matrizelluläres Protein interagiert TSP-1 auf verschiedenen Wegen mit der ECM. Über den Rezeptor Cluster of Differentiation 47 (CD47) stimuliert es die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und fördert dadurch die Bindung von Monozyten an Endothelzellen (Narizhneva et al., 2005).

Ferner greift TSP-1 über die Interaktion mit MMPs und TGF- β 1 in den Kollagen-Haushalt ein (Tang et al., 2011). Zudem beeinflusst es die extrazelluläre Quervernetzung der Kollagenfibrillen. So weist die Haut TSP-1-defizienter Mäuse eine

verringerte Konzentration des Proenzym Pro-Lysyl-Oxidase bei erhöhter Aktivität der katalytisch aktiven Lysyl-Oxidase auf (Rosini et al., 2018).

TSP-1 vermittelt zudem sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Prozesse. So aktiviert TSP-1 Makrophagen in Abhängigkeit vom toll-like receptor 4 (TLR4) über den Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). Zudem induziert TSP-1 die Bildung des Zytokins TNF- α über TLR4. Auf beide Prozesse scheint der Rezeptor Cluster of Differentiation 36 (CD36), der an die Thrombospondin type 1 repeats von TSP-1 bindet, einen modulierenden Effekt auszuüben (Li et al., 2013). Ebenfalls über CD36 kann TSP-1 die Apoptose von Endothelzellen induzieren (Lawler and Lawler, 2012).

Saban et al. zeigten, dass APC durch TSP-1 den Prozess der Allosensibilisierung von T-Zellen abschwächen können und damit gegen allogene Transplantate gerichtete Abstoßungsreaktionen unterbinden können (Saban et al., 2010).

Ebenfalls immunmodulatorisch wirkt die wahrscheinlich über eine Bindung an der KRFB-Sequenz des zweiten Thrombospondin repeats type 1 von TSP-1 vermittelte Aktivierung von TGF- β .

TGF- β induziert regulatorische T-Zellen sowie M2-Makrophagen und beeinträchtigt neben der Reifung von DC auch die Aktivität von natürlichen Killerzellen (Murphy-Ullrich and Suto, 2018). TGF- β wirkt in die Zell Homöostase unterschiedlicher Immunzellen des angeborenen und spezifischen Immunsystems ein und moduliert über DC vermittelte Immunreaktionen (Esebanmen and Langridge, 2017, Worthington et al., 2012). Daneben ist TGF- β eine zentrale Stellschraube der Bindegewebisdifferenzierung. So induziert TGF- β die Kollagenbildung und die Expression von Connective tissue growth factor (CTGF) (Cheong et al., 2019). Daneben induziert TGF- β aber auch den enzymatischen Abbau der ECM und vermittelt die Epithelial-mesenchymale Transition (Fang et al., 2016, Najafi et al., 2019). Ferner fördert TGF- β die Expression von α - / β -Integrin Untereinheiten und moduliert damit das Zelladhäsionsverhalten (Yang et al., 2013). Diese Eigenschaften legen nahe, aus der Interaktion von TSP-1 mit TGF- β eine Relevanz von TSP-1 für die Biomaterialintegration abzuleiten.

Die Funktion, die TSP-1 im Rahmen der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten einnimmt, wurde bisher noch nicht untersucht und wird als zentrale Fragestellung dieser Arbeit beleuchtet.

4.7 Modell der transparenten Rückenhautkammer und *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*

Der Ansatz, über transparente Fensterung lebendes Gewebe im Versuchstier mikroskopisch zu untersuchen, wurde erstmals von Sandison et al. in den 1920er Jahren an den Ohren von Kaninchen angewandt (Menger et al., 2002, Sandison, 1928). 1943 dann stellten Algire et al. auf diese Weise als erste Arbeitsgruppe die Gefäßnetze der dorsalen Hautfalte von Mäusen dar (Algire, 1943), um Angiogenese im Kontext der Wundheilung sowie Tumorwachstum zu untersuchen (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

Papenfuss et al. stellten das Rückenhautkammermodell 1979 an der Ratte vor, Endrich et al. 1980 dann am Goldhamster (Endrich et al., 1980, Papenfuss et al., 1979).

Das Rückenhautkammermodell gestattet die repetitive intravital-mikroskopische Untersuchung im Rahmen verschiedenster Fragestellungen. So etwa zur Pathophysiologie von Tumoren, zum Migrationsverhalten unterschiedlicher Zelltypen, zur Wundheilung, zur Hämostase aber insbesondere auch zur Biokompatibilität von Fremdmaterialien (Schreiter et al., 2017). Die Methode ermöglicht vergleichsweise lange Beobachtungszeiträume von bis zu drei Wochen in Verbindung mit der Möglichkeit der quantitativen Analyse von Angiogenese, Entzündungsprozessen, der Mikrozirkulation und anderen vaskulären Prozessen. Dies erklärt den besonderen Stellenwert dieses Tiermodells für die Grundlagenforschung im Bereich Tumorangiogenese und Tissue Engineering (Laschke and Menger, 2016a). Insbesondere zur Biomaterialintegration von PPE-Implantaten wurden wegweisende Daten in der DSC erhoben (Ehrmantraut et al., 2012, Hessenauer et al., 2018, Hussain et al., 2021, Laschke et al., 2014, Reichel et al., 2015, Später et al., 2020, Strieth et al., 2010).

Nach Anbringung der Kammer empfiehlt es sich, dem Versuchstier eine bis zu 72h Erholungsphase zu gewähren, um die durch Narkose und das chirurgische Trauma bedingten Effekte zu minimieren (Lehr et al., 1993). In diesem Zeitraum sollte - neben den ohnehin unerlässlichen Kontrollen des tierischen Wohlbefindens - eine Evaluation des Beobachtungsfeldes auf Anzeichen von Blutungen, Entzündungen oder anderen potenziellen Störfaktoren erfolgen (Lehr et al., 1993, Sckell and Leunig, 2009).

In der DSC zeigen sich bei der Einbringung von PLGA-Gerüsten nach drei Tagen an den Implantaträndern erste Veränderungen der vaskulären Parameter wie die Dilatation von Kapillaren oder die Bildung neuer Gefäßstümpfe aus vorbestehenden Blutgefäßen. 14 Tage nach Implantateinbringung werden im Implantatkörper miteinander verbundene perfundierte mikrovaskuläre Netzwerke beschrieben (Rucker et al., 2006). Für PPE-Implantate zeigt sich eine ähnliche Dynamik der vaskulären Integration, wonach mikrovaskuläre Netzwerke im Zentrum des Implantatkörpers, die rudimentär sicher bereits 10 Tage nach Implantation in die DSC nachweisbar sind, ab dem 14. Tag flächendeckend miteinander verbunden und perfundiert sind (Ehrmantraut et al., 2010, Hessenauer et al., 2018, Strieth et al., 2010).

Der CAM Assay wurde bereits 1911 von Rous und Murphy et al. verwendet, um das Wachstumsverhalten von xenotransplantierten Tumoren zu untersuchen. Die weite Verbreitung der Methode in Verbindung mit der leichten Verfügbarkeit und der vergleichsweise einfachen Handhabung führten dazu, dass die Methode in zahlreichen Variationen Verwendung findet. Grob lassen diese sich in *in ovo* und *ex ovo*-Varianten unterteilen (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

Die Chorioallantoismembran (CAM) ist eine bei Vögeln vorkommende extraembryonale Membran, die durch die Fusion des somatischen Mesoderms des Chorion mit dem splanchnischen Mesoderm der Allantois zwischen Embryonaltag 3 und 10 entsteht (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Ihre wesentlichen Aufgaben bestehen im Gas-Austausch, in der Regulation des Säure-Basen-Haushalts, in der Resorption von Ionen und Wasser aus der Allantoisflüssigkeit und im Calcium-Transport zur Knochenbildung im Embryo (Gabielli and Accili, 2010, Marshall et al., 2020). Die CAM weist ein sehr dichtes Kapillarnetz auf und eignet sich dementsprechend zur Quantifizierung angiogenesefördernder und angiogenesehemmender Effekte (Mangir et al., 2019). Insbesondere zur Untersuchung von Fragestellungen aus den Gebieten Toxikologie, Wundheilung, Knochenbildung und Tumorbilogie wird das CAM Assay eingesetzt (Eckrich et al., 2020, Baiguera et al., 2012, Gabielli and Accili, 2010, Miller

et al., 2004, Ribatti, 2017). Ähnlich der transparenten Rückenhautkammer ist die Methode der repetitiven intravital-mikroskopischen Beobachtung und intravenösen Applikation von Fluorophoren wie FITC-Dextran zugänglich (Iruela-Arispe et al., 1999). Gleichwohl es sind aufgrund des fragilen vaskulären Netzwerkes Versuchsprotokolle, die wiederholte intravasale Applikationen beinhalten, im CAM Assay schwer umsetzbar (Schneider-Stock and Ribatti, 2021).

Ein großer praktischer Vorteil der Verwendung des CAM Assay ist die kostengünstige Verfügbarkeit der Methode im Vergleich zu anderen *in vivo*-Modellen (Baiguera et al., 2012, Eckrich et al., 2020). Einer von Buhr et al. vorgelegten Kostenanalyse ist zu entnehmen, dass die auf einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen normierten Gesamtkosten, die im CAM Assay im Kontext der Xenotransplantation von Tumorzellen entstehen um den Faktor 17 niedriger ausfallen als in xenotransplantierten Nagetieren (Buhr et al., 2020). Für Xenotransplantate wurde von Eckrich et al. ebenfalls ein deutlich niedrigerer Kostenfaktor im Vergleich zu immundefizienten SCID Mäusen beschrieben (Eckrich et al., 2020). Aufgrund des fehlenden Schmerzempfindens vor Embryonaltag 15 ist das CAM Assay keinen tierschutzrechtlichen Beschränkungen ausgesetzt (Ribatti, 2017).

Vor dem Hintergrund der oft geringen Übertragbarkeit der Ergebnisse von *in vitro* getesteten Biomaterialien auf deren Abschneiden im Tierexperiment, sehen Kohli et al. Potenzial in der Nutzung des CAM Assay als aussagekräftige präklinische *in vivo*-Screening-Methode (Kohli et al., 2020). Auch für die Analyse von Biomaterialien ist ein großes Potential dieser Methode insbesondere zur Evaluation angiogener Prozesse vorbeschrieben (Heimes et al., 2020, Merckx et al., 2020, Moreno-Jimenez et al., 2016). Zwadlo-Klarwasser et al. zeigten, dass mittels der CAM das angiogene und inflammatorische Potenzial von Polyurethan und anderen Polymeren beurteilt werden kann (Zwadlo-Klarwasser et al., 2001). Gleichwohl stellt sich die Frage, inwieweit angesichts der biologischen Unterschiede zwischen Huhn und Mensch Schlussfolgerungen aus Beobachtungen in der CAM auf den menschlichen Organismus gezogen werden können (Baiguera et al., 2012). Die Unterschiede zwischen Säugetieren und Vögeln hinsichtlich physiologischer und metabolischer Prozesse bedingen ferner, dass bei der Verwendung beispielsweise von Antikörpern oder Zytokinen speziesspezifische Besonderheiten bedacht werden müssen (Kundeková et al., 2021). Neben den speziesspezifischen Unterschieden muss berücksichtigt werden, dass die Stoffwechselforgänge und Angiogenese in der CAM im Kontext der Embryonalentwicklung und damit in einem stark anabolen und proangiogenen Milieu ablaufen (Gabrielli and Accili, 2010).

Zudem ist das Immunsystem im CAM Assay nicht ausgereift. So sind beispielsweise T-Zellen erst ab dem 11. Entwicklungstag nachweisbar und das Auftreten zellulär vermittelter Immunmechanismen ist frühestens ab dem 13. Entwicklungstag beschrieben (Ribatti, 2017). Diese Methodik-immanente Immundefizienz, die aber gleichzeitig das Einbringen von Xenotransplantaten ermöglicht, muss bei der Interpretation von Beobachtungen im CAM Assay berücksichtigt werden (Li et al., 2015, Auerbach et al., 2003).

Die Einbringung pro-angiogener Mediatoren in polymerisierten Trägermaterialien oder kleinen Filtern auf das CAM Assay ruft mit einer Latenz von 72 bis 96h eine Erhöhung der Gefäßdichte und eine speichenartig zum Stimulus hin ausgerichtete Gefäßarchitektur hervor. Dagegen ist bei der Einbringung angiogenesehemmender Mediatoren eine Abnahme der Gefäßdichte zu beobachten bis hin zu einer vollständigen Rückbildung der an die Trägergerüste angrenzenden Gefäße (Ribatti, 2017).

DSC und CAM Assay sind wie oben ausgeführt jahrzehntelang etablierte und dadurch eingehend erforschte Modelle, sodass bei der Versuchsplanung und -durchführung sowie bei der Ergebnisanalyse auf eine umfangreiche wissenschaftliche Literatur zurückgegriffen werden kann (Laschke and Menger, 2016a, Lehr et al., 1993, Sckell and Leunig, 2009, Auerbach et al., 2003, Gabrielli and Accili, 2010, Moreno-Jimenez et al., 2016, Ribatti, 2017).

5 Material und Methoden

Die im Folgenden vorgestellten Tierexperimente wurden im Forschungslabor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in Mainz unter Genehmigung des zuständigen Landesuntersuchungsamtes (G 15-1-066 et Addenda) durchgeführt. Das tierexperimentelle Protokoll wurde auf Basis des 3R-Prinzips (Tannenbaum and Bennett, 2015) erstellt und vor Beginn der Experimente durch eine unabhängige Kommission beurteilt. Der Umgang mit den Labortieren orientierte sich strikt an den „Principles of Laboratory Animals“ der National Society for the Medical Research (USA) (Council, 2010).

Sämtliche Tierexperimente wurden unter Supervision durch den Versuchsleiter oder stellvertretenden Versuchsleiter durchgeführt und täglich protokolliert (siehe Tabelle 3, Seite 99). Alle übrigen Untersuchungen wurden gemäß des Prinzips der Good Laboratory Practice durchgeführt (Macleod et al., 2009).

Als Versuchstiere wurden männliche TSP-1^{-/-} (Thbs^{1tm1hyn}/J) K.O.-Mäuse der Rasse C57/Bl6J sowie in der Kontrollgruppe genetisch unveränderte männliche Mäuse der Rasse C57/Bl6J (Janvier Labs CERJ, 53940 Le Genest Saint Isle, Frankreich) ab einem Alter von 6 Wochen und einem Körpergewicht von 25g eingesetzt. Die Tiere wurden in den Räumlichkeiten des Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz, Mainz gepflegt und für die Experimentation und *in vivo* Analyse in das HNO-Labor überführt. Außerhalb der Experimente wurden den Tieren ein Zugang zu Wasser und Mäuse spezifischem Futter (Sniff; Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libidum gewährt. Darüber hinaus wurde ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus sowie eine konstante Raumtemperatur von 21°C gewährleistet. Vor Experimentation wurden die Tiere in Gruppen von 5 Tieren pro Käfig gehalten. Nach Experimentation wurden die Tiere unter Beibehaltung der oben genannten Haltungsbedingungen in Einzelkäfige überführt. Die Pflege der Tiere beinhaltete die tägliche Kontrolle der Vitalität und die Bewertung des Allgemeinzustandes. Eine adäquate Analgesie wurde über das Einbringen von 0,1 mg/ml Tramadol in das autoklavierte Trinkwasser sichergestellt.

Am Versuchsende wurden die Tiere mit einer Überdosis intraperitoneal applizierter Narkosemittel von >200mg/kg Ketamin (KETANEST®, Pfizer Pharma PFE GmbH, Berlin, Deutschland) und >20mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert und zervikal disloziert.

5.1 Versuchsprotokolle

5.1.1 Versuchsprotokoll zu Versuch 1: Modell der transparenten Rückenhautkammer

In der DSC wurde die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten in zwei Gruppen untersucht. Die Versuchsgruppe umfasste männliche TSP-1^{-/-} (Thbs^{1tm1hyn}/J) Knockout Mäuse (n=8) der Rasse C57/Bl6J, während sich die Kontrollgruppe aus männlichen Wildtyp C57/Bl6J Mäusen (n=8) rekrutierte.

Nach Kammerimplantation wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt und anschließend schloss sich eine Erholungsphase von 48h an.

Nach Abschluss der Erholungsphase erfolgte die Einbringung des PPE-Implantates in das Beobachtungsfeld, ab diesem Zeitpunkt beginnt der Versuch mit Versuchstag 1. Nach Implantation wurden täglich mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Rückenhautkammer angefertigt.

An den Versuchstagen 3, 7 und 10 erfolgte die Applikation von Rhodamin 6G (Rhodamin 6 G Dye content ~95 %, Sigma (Merck KGaA), Deisenhofen, Germany) und Fluoreszein Isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextransulfat Natriumsalz average mol. wt. 500,000, Sigma (Merck KGaA), Deisenhofen, Deutschland) und es wurden 30sekündige Videoaufnahmen der direkt an das Implantat angrenzenden ROI 1 bis 6 und der mindestens 200µm vom Implantat entfernten, peripheren ROI 7 bis 12 aufgezeichnet.

An Versuchstag 10, 12 und 14 wurden zusätzliche Übersichtsaufnahmen der Implantate angefertigt. An Versuchstag 14 erfolgte die explorative Applikation mittels Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) (Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit, Thermofisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) - gefärbter isogener Spenderthrombozyten und es wurden 30sekündige Videoaufnahmen der direkt an das Implantat angrenzenden ROI 1 bis 6 aufgezeichnet.

Nach Opferung unter terminaler intraperitonealer Narkose erfolgte die Messung der dynamischen Desintegrationskraft und die histologische Fixierung der Implantate.

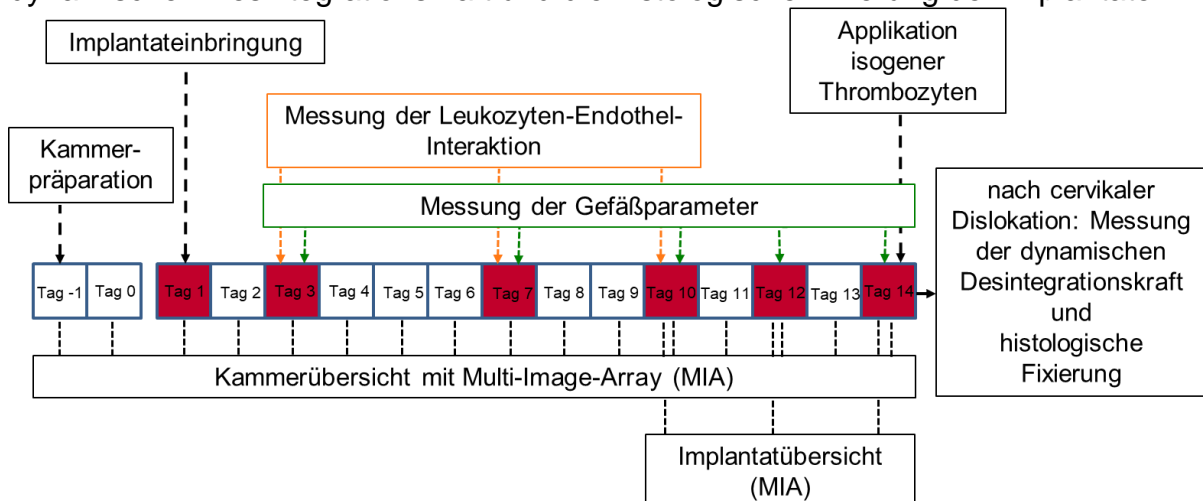


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Versuchsprotokolles von Versuch 1.

5.1.2 Versuchsprotokoll zu Versuch 2: *Hen´s egg test on chorioallantoic membrane*

Im CAM Assay wurde der Einfluss einer Oberflächenmodifizierung mit TSP-1 auf die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten untersucht.

Es wurden vier Versuchsgruppen gebildet, die als Oberflächenmodifizierung entweder TSP-1 oder VEGF-A oder NaCl appliziert bekamen oder unbehandelt blieben. Die Zuordnung der PPE-Implantate und Eier zu einer Versuchsgruppe erfolgte randomisiert.

Die Implantate wurden 24h nach Exposition der CAM aufgebracht und im direkten Anschluss daran erfolgte die Oberflächenmodifizierung. In der Kontrollgruppe blieb das eingelegte PPE-Implantat unbehandelt. In der NaCl-Gruppe wurden 5µl NaCl appliziert. In der VEGF-A-Gruppe wurden 5µl einer VEGF-A-NaCl-Lösung der Konzentration 10µg pro ml appliziert, was einer Zieldosis von 50ng VEGF-A entspricht. In der TSP-1-Gruppe wurden 5µl einer TSP-1-NaCl-Lösung der Konzentration 117,5µg pro ml appliziert, was einer Zieldosis von 558,75ng TSP-1 entspricht.

An den Beobachtungstagen 7 und 10 wurden Übersichtsaufnahmen der PPE-Implantate und des Implantatlagers erstellt. Im Implantatlager wurden an jeder Randkante des Implantates jeweils ein quadratisches 1mm²-messendes Beobachtungsfeld als ROI definiert.

Nach Opferung der Embryonen erfolgte die histologische Fixierung der Implantate einschließlich eines Abschnitts der umliegenden CAM.

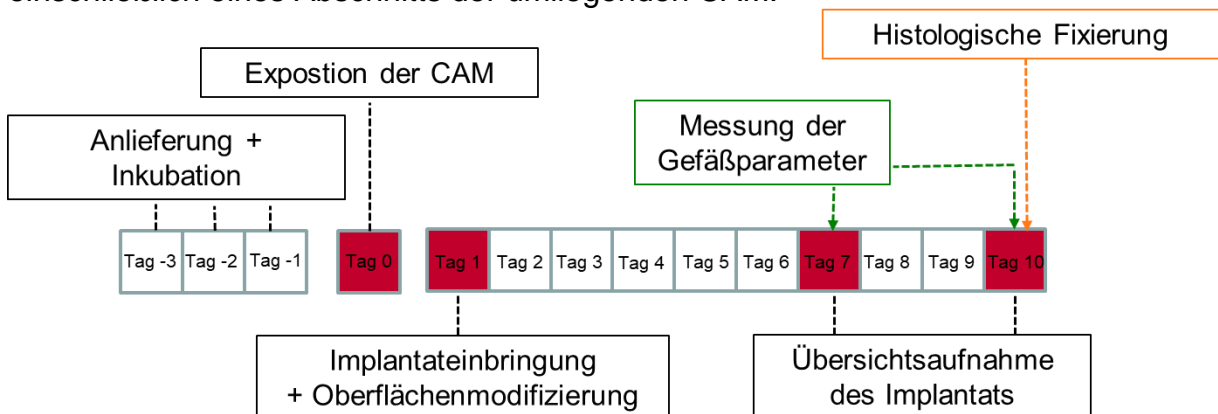


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Versuchsprotokoll von Versuch 2.

5.2 Zuschneiden der Implantate aus porösem Polyethylen

Das PPE (MEDPOR®, Stryker Corporation, Kalamazoo, Michigan, Vereinigte Staaten von Amerika) wurde unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank (Hera-Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland) mit einem Federskalpell in 3,0 x 3,0 x 0,25mm große Teilstücke zugeschnitten. Die Teilstücke wurden anschließend in autoklavierte 1,5ml Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) überführt und anschließend bei 121°C und 2,05 Bar für 20 min dampfsterilisiert (Tuttnauer systec 5050 ELVC, Tuttnauer Europe b.v., Breda, Niederlande), um Keimfreiheit zu garantieren. Bereits vor Beginn wurde die strukturelle Integrität und Unversehrtheit des PPE nach Dampfsterilisation auflichtmikroskopisch überprüft und Veränderungen der Implantatstruktur ausgeschlossen.

5.3 Versuch 1: Modell der transparenten Rückenhautkammer

5.3.1 Präparation der transparenten Rückenhautkammer

Der Kammerrahmen der DSC setzt sich zusammen aus zwei spiegelbildlich-kongruenten Titanplatten mit jeweils einer zentralen runden Fensterung mit einem Durchmesser von 11,8mm sowie 3 Bohrungen für Schrauben und 12 kleineren Bohrungen zur Fixierung der Kammer an der Rückenhaut durch Hautnähte (siehe Abbildung 9). In die Fensterung wird ein rundes Deckglas mit einem Querdurchmesser von 11,8mm sowie einer Dicke von 0,1mm eingelegt. Fixiert wird das Glas mittels eines Sprengtringes, welcher von außen in die Fensteröffnung geklemmt wird. Um die Platten stabil gegensätzlich zu fixieren werden insgesamt drei Schrauben (d = 1,8mm) durch die oben genannten Bohrlöcher geführt. Dabei gewährleisten Distanzmuttern eine Fixierung der Titanplatten ohne Kompression des dazwischenliegenden Gewebes.

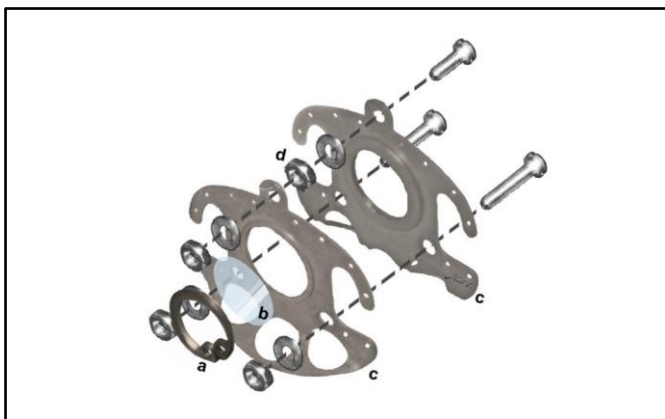


Abbildung 9: Aufbau des Titanrahmens der transparenten Rückenhautkammer.

a: Sprengring, b: Deckglas, c: Titanrahmen, d: Mutter und Distanzscheibe

Die Abbildung ist der Publikation „Surface Modification of Porous Polyethylene Implants with an Albumin-Based Nanocarrier-Release System.“ (Eckrich et al., 2021b) entnommen.

Die im Folgenden beschriebene Präparation der DSC steht auf der Grundlage der von Laschke et al. beschriebenen Vorgehensweise mit den von Eckrich et al. vorgenommenen Modifizierungen (Eckrich et al., 2021a, Eckrich et al., 2021b, Laschke et al., 2011).

Vor Kammerimplantation wurden die Tiere mittels intraperitonealer Narkose mit 100mg/kg Ketamin (KETANEST®, Pfizer Pharma PFE GmbH, Berlin, Deutschland) und 10mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Nach Applikation des Anästhetikums wurden die Tiere auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (MEDAX, GmbH & Co.KG, 24537 Neumünster, Deutschland) überführt. Bei Ausfall von Stellreflex, Lidreflex und Zwischenzehenreflex wurde eine ausreichende Narkostiefe als gewährleistet angesehen und nach Aufbringen eines Augenschutzes (Cornegel®, BAUSCH & LOMB GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit der Depilation der Rückenhaut begonnen.

Die Narkosetiefe wurde vor allen potenziell schmerzhaften Teilschritten der Operation reevaluiert und durch erneute Applikation von Anästhetika bis zum Ausfall der oben genannten Reflexe vertieft.

Nach grober Haarentfernung mittels Haartrimmer (REMINGTION® CONTOUR, Spectrum Brands, Middleton, Wisconsin, USA) wurde das Fell im Bereich der Rückenhaut mittels Enthaarungscreme (Veet® Enthaarungscreme, Reckitt Benckiser Group plc, Berkshire, UK) depiliert. Danach wurde die Rückenhaut zunächst mit einer feuchten Kompresse von Haarrückständen befreit und mit 70% Ethanollösung desinfiziert. In Transillumination erfolgte die Identifikation möglichst großvolumiger Anteile des Gefäßplexus innerhalb des subcutanen musculoaponeurotischen Systems (*Panniculus carnosus*). Nach Anpassung des Kammerfensters an einen geeigneten Gefäßstamm wurde die Rückenhaut im kranialen und kaudalen Anteil mit zwei Haltefäden (Ethibond Excel 4-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) angeschlungen und an einer zweiarmigen Halterung oberhalb des Rückens unter moderatem Zug fixiert. Im Anschluss wurde auf die rechte Flanke der Maus, auf der dem Operateur abgewandten Seite, die Titanplatte, die die Rückseite der Kammer bilden soll, mit durchgreifenden U-Nähten fixiert.

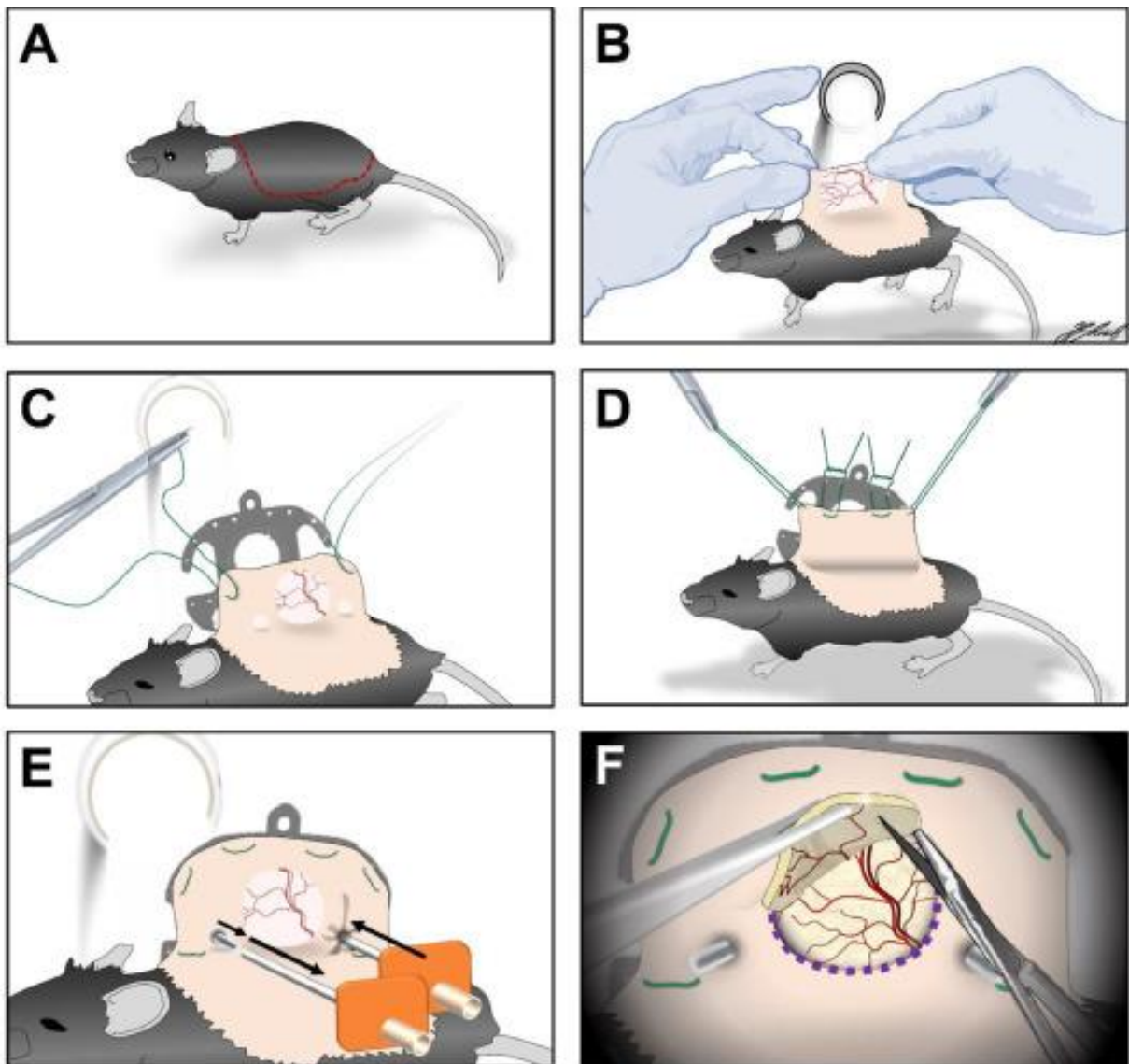


Abbildung 10: Darstellung der Präparation der transparenten Rückenhautkammer.

Die Grafik ist der 2021 von Eckrich et al. veröffentlichten Publikation „*In vivo* analysis of noise dependent activation of white blood cells and microvascular dysfunction in mice.“ entnommen. Dargestellt sind die wesentlichen Arbeitsschritte der Präparation der transparenten Rückenhautkammer: A) Markierung des Depilationsfeldes B) Aufsuchen eines geeigneten Gefäßplexus mittels Transluminations C) Anbringung des hinteren Titanrahmens D) Fixierung der Rückenhautfalte am hinteren Titanrahmen mittels chirurgischem Faden E) Anlage zweier Stichkanäle zur späteren Fixierung beider Titanrahmen mit Schrauben F) Resektion der Haut und des muskulokutanen Gewebes mittels mikrochirurgischer Instrumente unter Mikroskopsicht (Eckrich et al., 2021c).

Nach Fadenarmierung der Kammer wurden durch Punktion der Haut oberhalb der Bohrungen mit einer Strauß-Kanüle des Durchmessers von 1,8mm (DISPOMED WITT oHG., Gelnhausen, Deutschland) Stichkanäle für die Einlage der unteren Fixierschrauben angelegt. Die Fixierschrauben wurden durch die Bohrungen der

Kammer und durch den Stichkanal geführt. Mittels Transillumination wurde im Anschluss die exakte Position der Haut oberhalb des Sichtfensters ermittelt und mit einem hautverträglichen Filzstift (Securline Skin Marker, Aspen Surgical Products, Caledonia, Michigan, USA) angezeichnet. Nach Positionierung der Maus auf der rechten Flanke erfolgte nun die mikrochirurgische Präparation des Kammerfensters unter dem Operationsmikroskop (ZEISS OPMI 1FC, Carl Zeiss Meditec VG, Oberkochen, Deutschland).

Nach Resektion der Haut sowie des darunter gelegenen Bindegewebes und der Anteile des Rückenmuskels auf der dem Operateur zugewandten Seite, ist eine direkte Sicht auf den *Panniculus carnosus* der Gegenseite einschließlich der dort eingebetteten Gefäße möglich. Um ein Austrocknen des Gewebes und eine Thrombosierung des Gefäßplexus zu verhindern, wurde das Operationsgebiet während der Präparation mit 0,9% NaCl-Lösung (B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland) benetzt.

Nach Abschluss der Präparation wurde der zweite Titanrahmen über die Fixierschrauben in Richtung der Rückenhaut geführt und nach Adaption des Gewebes am Kammerfenster mit Fixiermuttern verschlossen. Zur Vermeidung von Druckläsionen wurden die Unterkanten der Titanrahmen oberhalb der Flanke des Tiers mit einer Polsterung aus hautverträglichem Klebeband (Leukosilk, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) umgeben.

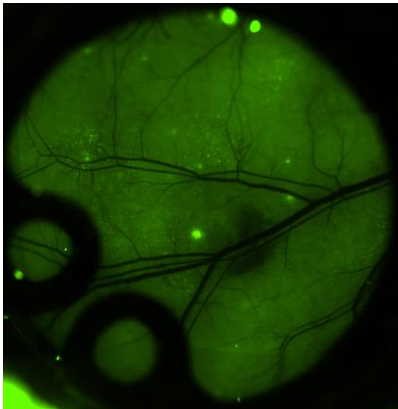


Abbildung 11: Multi Image Array des Beobachtungsfeldes der Rückenhautkammer im grünfluoreszenten Kanal unmittelbar nach Kammerpräparation.

5.3.2 Einbringung der Implantate aus porösem Polyethylen in die transparente Rückenhautkammer

48h nach erfolgter Kammerpräparation wurden die PPE-Implantate mittig in den Beobachtungsbereich eingebracht. Hierzu wurden die Mäuse in einer modifizierten Plexiglasröhre immobilisiert und der Sprengring zum Verschluss des Kammerfensters wurde mittels einer Präparierklemme entfernt. Nach Anfeuchten des Gewebes im Bereich des Kammerfensters mit 0,9% NaCl-Lösung wurde nach Auflage eines neuen Deckglases die Kammer mit dem zuvor entfernten Sprengring verschlossen. In lichtmikroskopischer Kontrolle (ZEISS OPMI 1FC, Carl Zeiss Meditec VG, Oberkochen, Deutschland) wurde anschließend die korrekte Lage des Implantates sowie das Fehlen von Lufteinschlüssen im Kammerfenster verifiziert (siehe Abbildung 12, Seite 38).



Abbildung 12: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des Beobachtungsfeldes der transparenten Rückenhautkammer nach Implantateinbringung.

5.3.3 Intravitalmikroskopie in der transparenten Rückenhautkammer:

Nach Einbringen der PPE-Implantate wurden an jedem Versuchstag fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen angefertigt. Um die Fluoreszenzmikroskopie durchführen zu können, wurden die Versuchstiere in einer Plexiglasröhre immobilisiert (siehe Abbildung 13, Seite 39). Eine unilaterale 1cm breite Bohrung am Eingang zur Röhre ermöglichte die adäquate Zufuhr von Frischluft während der Experimentation. Ein individuell angefertigter Plexiglas Deckel mit konischer Auslassung zum Heranführen des Objektivs ermöglichte die Fixierung der Kammer und des Versuchstieres auf der Arbeitsplatte. Die Platte wurde anschließend auf dem XY-Präzisionstisch (MT-mot Messtisch, mt-Märzhäuser Tango Steuereinheit und ERGODRIVE Bedienelement, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland) fixiert und der Observationsbereich durch Adjustierung des x-y-Präzisionstisches in den Bereich des Kammerfensters gelegt. Zunächst wurde in 40facher Vergrößerung ein Multi Image Array (MIA) des gesamten Kammerfensters durch die im Steuerprogramm Cell-Sens-Dimension (Olympus Europa SE&Co.KG, 20097 Hamburg, Deutschland) implementierte „automatische MIA“- Funktion erstellt (siehe Abbildung 15, Seite 41).

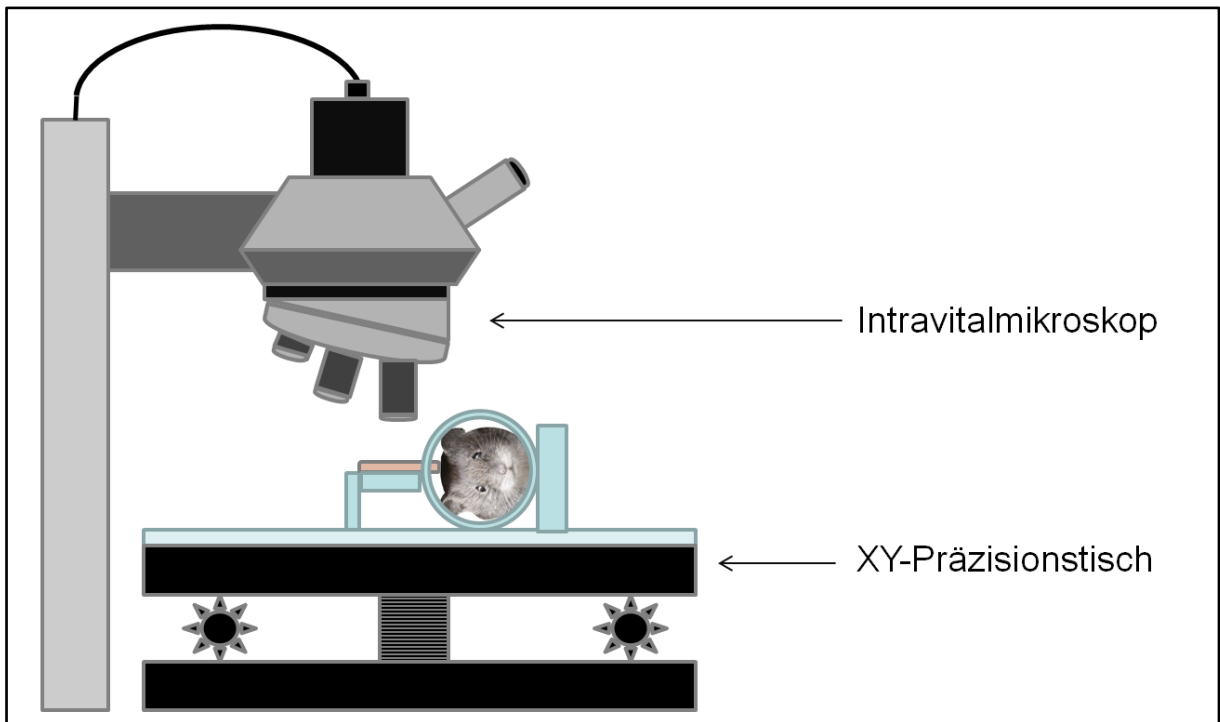


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Positionierung des Versuchstieres auf dem XY-Präzisionstisch.

Mikroskop: Olympus BXFM-Intravitalmikroskop (Olympus Europa SE&Co.KG, 20097 Hamburg, Deutschland). XY-Messtisch: MT-mot Messtisch mt-Märzhäuser Tango Steuereinheit und ERGODRIVE Bedienelement (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland). Lichtquelle: X-Cite exacte 200W Quecksilberdampf Lampe, (Excelitas Technologies GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Kamera: Olympus XM-10. Steuersoftware: Cell-Sens-Dimension (Olympus Europa SE&Co.KG, 20097 Hamburg, Deutschland).

Im Kammerfenster wurden nach erster Aufnahme 13 ROI nach den folgenden Kriterien festgelegt: Eine unpaare ROI deckt die komplette Fläche des Implantates ab und ist als Polygon möglichst genau an die Form des Implantates angepasst und weist daher aufgrund der Kantenlängen der zugeschnittenen Implantate von 3mm eine Größe von 9mm² auf.

Sechs quadratische zufällig um das Implantat platzierte ROI mit einer Kantenlänge von 1mm, welche den Randbereich direkt um das Implantat abdecken (Gesamtfläche 6mm²).

Sechs quadratische zufällig in der Kammer platzierte RIO ebenfalls mit einer Kantenlänge von 1mm und mit einem minimalen Abstand zum Implantat von 200µm (Gesamtfläche 6mm²) (siehe Abbildung 14, Seite 40).

Die Koordinaten der einzelnen ROI wurden im System hinterlegt und repetitive Aufnahmen der ROI nach dem unten genannten Studienprotokoll erstellt. Bei konstanter Belichtungszeit und Verstärkung wurden so an den Beobachtungstagen Einzelaufnahmen und 30-sekündige Videos der einzelnen ROI erstellt.

Die Rohdateien der Bilder wurden im VSI-Format mit Einbettung sämtlicher Metadaten auf dem Computer gespeichert.

Die Videos wurden als unkomprimierte AVI-Dateien auf der Festplatte gespeichert. Nach Markierung des Gefäßnetzes innerhalb des ROI über die „Zählen und Messen“-Funktion von Cell Sens Dimension wurden zur Messung der Anzahl an Verzweigungen und Gefäßstümpfen mittels der Grafikanalysesoftware Fiji, Duplikate der Bilder im JPG Format auf der Festplatte hinterlegt.

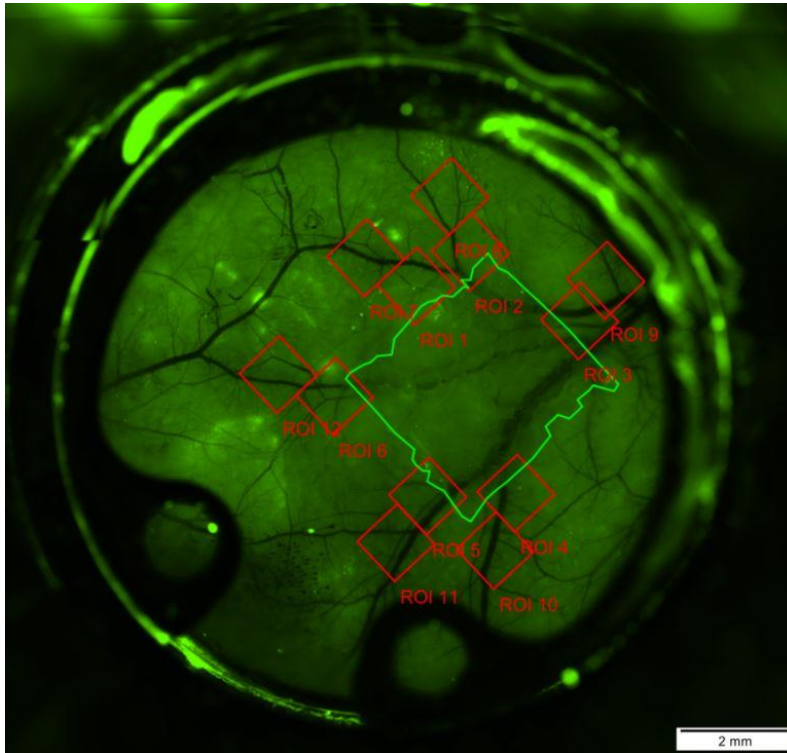


Abbildung 14: Mutli image array mit Projektion der Regions of interest auf Implantat und Implantatlager.

Die Übersichtsaufnahme wurde an Versuchstag 3 angefertigt. Grün umrandet ist die unpaare Region of interest (ROI), die das Implantat abdeckt, hervorgehoben. Im Implantatlager sind die sechs inneren und sechs äußeren ROI rot markiert. Der Messbalken in der rechten unteren Bildecke weist eine Länge von 2mm auf.

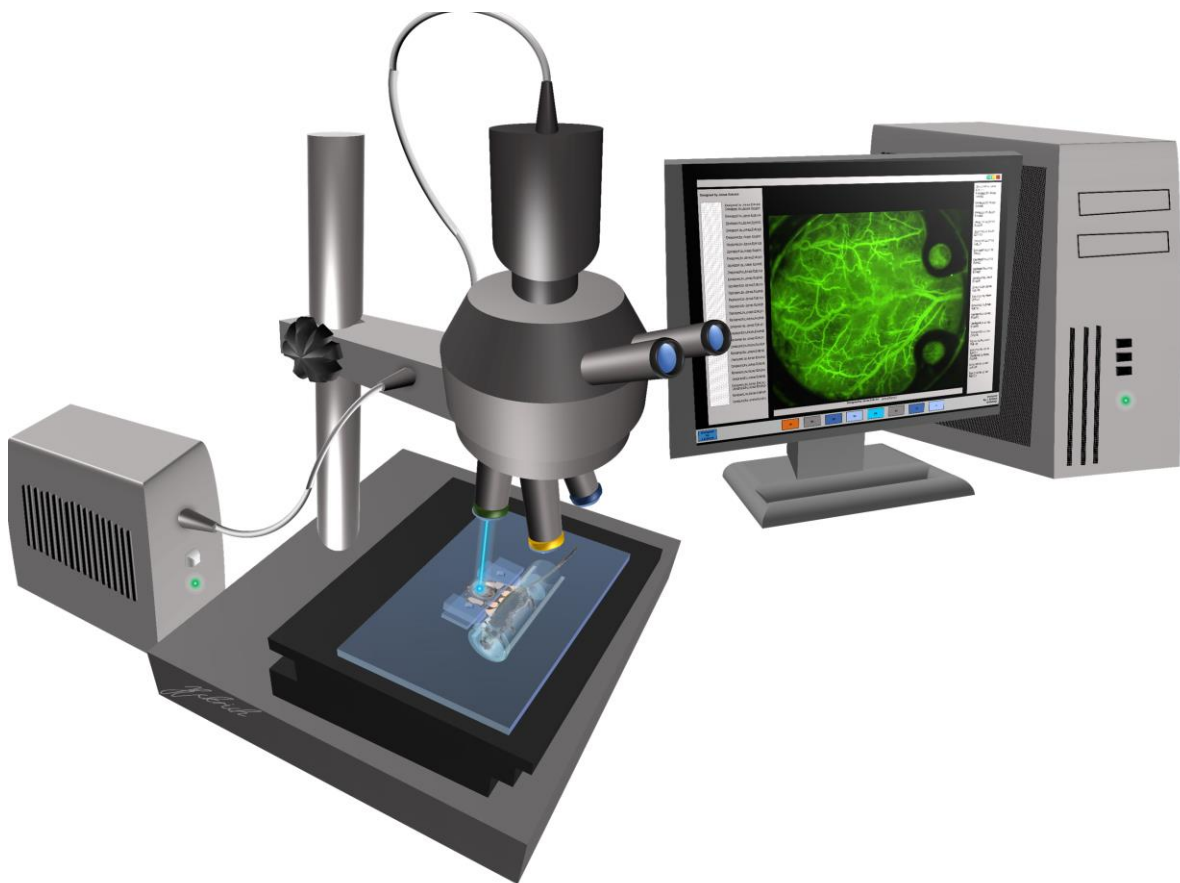


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Mikroskop-Arbeitsplatzes.

Das Versuchstier befindet sich nach der intravenösen Applikation des Fluorophors FITC-Dextran in einer Plexiglasröhre auf dem XY-Präzisionstisch. Der Titanrahmen der Rückenhautkammer ist durch eine zusätzliche Arretierung aus Plexiglas fixiert. Unter intravitalmikroskopischer Sicht werden die Randbereiche des Kammerfensters aufgesucht und deren Position an die Steuersoftware übermittelt. Nun erfolgt die automatisierte Erstellung eines Multi image arrays (MIA) durch die Anfertigung einer Aufnahmenserie beim Abfahren des vorgegebenen Bereiches. Auf dem Monitor ist das fertige MIA abgebildet.

5.3.4 Intravenöse Applikation der Fluorophore und Tracer

Durch intravenöse Applikation von Rhodamin 6G wurden die intravasalen Leukozyten markiert. Die von Spendertieren gewonnenen Thrombozyten wurden vor der Transfusion *in vitro* mit Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester [CFDA-SE] sichtbar gemacht. Die perfundierten Gefäßplexus ließen sich durch die Applikation von FITC-Dextran abgrenzbar darstellen.

Nach Immobilisation wurde die Haut vor der Punktion mit Emla 25 mg/g + 25 mg/g (25 mg/g Lidocain+ 25 mg/g Pilocain Creme) (AstraZeneca Deutschland GmbH, 22880 Wedel, Deutschland) für 5 Minuten anästhesiert. Anschließend wurde nach Hautdesinfektion mit 70% Ethanollösung und Anwärmen des Schwanzes mit einer Infrarotlampe die *Vena caudalis mediana* mit einer 30G Kanüle (BD Microlance™ 3, Becton,Dickinson and Company LTD, Louth, Ireland) punktiert und der jeweilige Fluorophor intravenös appliziert.

5.3.4.1 Applikation von Fluorescein Isothiocyanat–dextran (FITC-Dextran)

Zur intravital-mikroskopischen Darstellung des Gefäßplexus und dessen Perfusion wurde mit Fluorescein markiertes Dextran (Molekulargewicht 500kDa) als Plasmamarker verwendet. Durch die Größe des Dextranmoleküls verbleibt der Fluorophor intravasal und ermöglicht nach Verteilung im Gefäßsystem die selektive Darstellung des Gefäßplexus innerhalb des Kammerfensters. Es wurden jeweils ca. 0,1 ml einer 5%-FITC-Dextran Lösung in NaCl 0,9% appliziert bei Verwendung des FITC-spezifischen Mikroskopfilters (Exzitation [Ex]:470nm; Emission [Em]: 525nm) (CHROMA 49002 - ET - EGFP (FITC/Cy2), Chroma® Technology Corp, Bellows Falls, Vermont,USA) (siehe Abbildung 16).

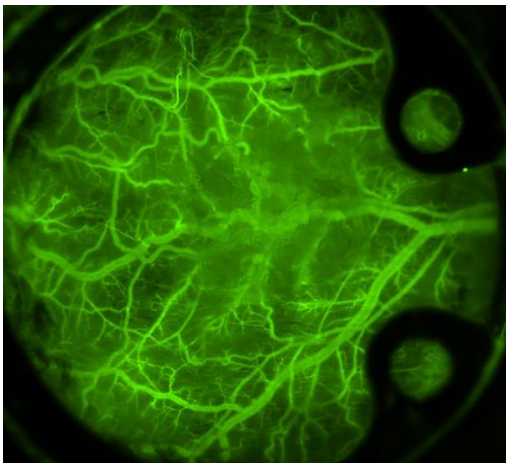


Abbildung 16: Multi image array des Beobachtungsfeldes der transparenten Rückenhautkammer nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran.

Durch die Größe des Dextranmoleküls verbleibt der Fluorophor intravasal und kann damit zur Darstellung der vaskulären Netzwerke genutzt werden. Die Aufnahme wurde an Versuchstag 3 angefertigt. In der Bildmitte befindet sich das PPE-Implantat.

5.3.4.2 Applikation von Rhodamin 6G

Um eine selektive Darstellung der Leukozyten zu realisieren, wurden ca. 0,1ml einer 0,1% Rhodamin 6G-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in NaCl 0,9% in die Vena caudalis mediana der immobilisierten Maus appliziert. Durch die Anreicherung des Rhodamin 6G in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran der im Blutstrom befindlichen Leukozyten können diese durch Verwendung eines Rhodamin 6G spezifischen Filters (Ex: 545nm; Em: 605nm) (CHROMA 49004 - ET - CY3/TRITC, Chroma® Technology Corp, Bellows Falls, Vermont, USA), in Epifluoreszenz sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 17).

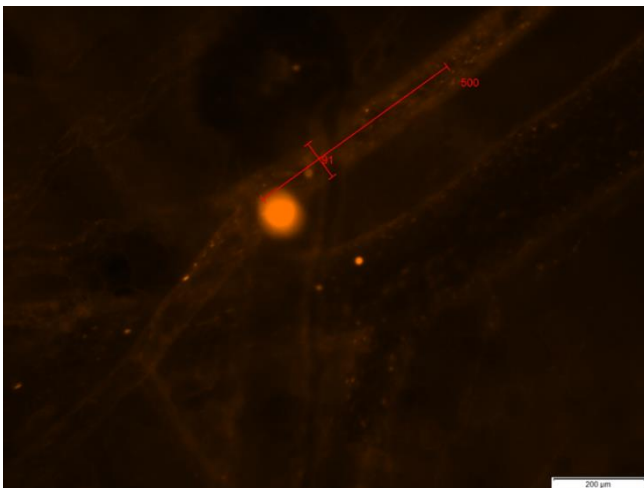


Abbildung 17: Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktion.

Abgebildet ist das Implantatlager nach intravenöser Applikation von Rhodamin 6G. Zur Auswertung der Leukozyten-Endothelinteraktion wurde ein 500µm langer Gefäßabschnitt markiert und der Gefäßdurchmesser bestimmt.

5.3.4.3 Thrombozytenisolation aus isogenen Spendertieren und Färbung mit 5[6] Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE)

Die Isolation der Thrombozyten erfolgte nach vorheriger Entnahme des Vollblutes eines isogenen Spendertieres in intraperitonealer Narkose mit 200mg/kg Ketamin (KETANEST®, Pfizer Pharma PFE GmbH, Berlin, Deutschland) und 20mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) durch Herzpunktion.

Nach Erreichen der adäquaten Narkosetiefe wurde das Tier in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert. Anschließend wurde die Haut über dem Sternum depiliert, desinfiziert und der zweite Interkostalraum links senkrecht parasternal mit einer 23 Gauge Kanüle (BD Microlance™ 3, Becton, Dickinson and Company LTD, Louth, Irland) punktiert. Anschließend wurde das Blut in eine 1,2ml Spritze mit Tri-Natriumcitrat-Lösung (3,2%) im Verhältnis 100 µL Tri-Natriumcitrat-Lösung auf 1 mL Vollblut vorsichtig aspiriert. Das mit Tri-Natriumcitrat-Lösung inkubierte Vollblut wurde anschließend vorsichtig durchmischt und danach in ein FACS-Röhrchen überführt. Dann wurde das Blut mit (Tyrodes-Puffer [pH 6,5]) im Verhältnis 1:1 aufgefüllt und mit 100g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer manuellen Mikroliter-Pasteurpipette abgenommen, in ein separates Röhrchen überführt und in 3ml Tyrodes-Puffer (pH 6,5) resuspendiert. CFDA-SE wurde nun in einer 20µM Endkonzentration in die Suspension gegeben und das Gemisch für 20min im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation folgte die erneute Zentrifugation bei 1200g für 10min. Der Überstand wurde nachfolgend abgenommen, verworfen und das Zellpellet erneut in 3ml Tyrodes-Puffer (pH 6,5) resuspendiert. Nach Resuspension wurde erneut zentrifugiert (1200g für 10min) und das Zellpellet anschließend in 500µl Tyrodes-Puffer (pH 7,4) resuspendiert.

Die angefärbten Thrombozyten wurden anschließend in die Vena caudalis mediana des Versuchstieres transfundiert. Die angefärbten Thrombozyten konnten anschließend in den definierten ROI durch Verwendung des FITC-spezifischen Mikroskopfilters (CHROMA 49002 - ET - EGFP (FITC/Cy2), Chroma® Technology Corp, Bellows Falls, Vermont, USA) *in vivo* visualisiert werden (siehe Abbildung 18).

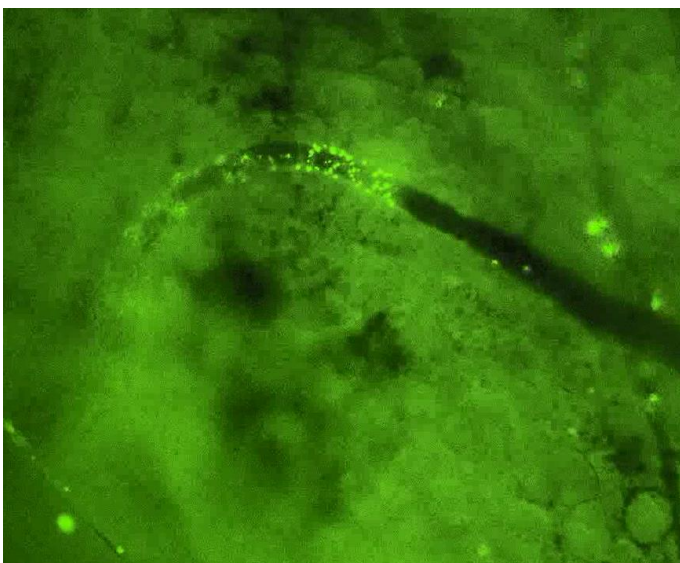


Abbildung 18: Aggregation CFDA-SE markierter Thrombozyten 10min nach Applikation.

Die Thrombozyten wurden einer TSP-1-defizienten Maus entnommen und in ein isogenes Versuchstier appliziert.

5.3.5 Bildanalyse

5.3.5.1 Gefäßparameter im Modell der transparenten Rückenhautkammer

Die Bildanalyse erfolgte nach dem von Eckrich et al. 2021 beschriebenen Vorgehen in zwei Schritten (Eckrich et al., 2021b). Die Messung der Gefäßlängen innerhalb der ROI wurde mit unkomprimierten VSI-Dateien durchgeführt. Unter Einbeziehung der Metadaten wurden die einzelnen Gefäßlängen direkt in der Analysesoftware Cell-Sens-Dimension bestimmt. Die Gefäßdichte ist definiert als Gesamtlänge der perfundierten Gefäßanteile innerhalb eines Beobachtungsfeldes (Kroth et al., 2008, Langer et al., 2002, Rucker et al., 2006, Strieth et al., 2010). Nur Gefäße mit im Video nachgewiesenem Erythrozytenflux wurden bei der Messung mit einbezogen. 10µm Durchmesser wurden als Untergrenze für die Berücksichtigung des Gefäßes gewählt, um auch bei kontinuierlicher Messung die Darstellbarkeit des Gefäßes zu gewährleisten. Für die Messung wurden die perfundierten Gefäße innerhalb jeder ROI digital nachgezeichnet.

Die Ergebnisse der Messung wurden in dem Microsoft Excel proprietären Dateiformat „xls.“ exportiert. Die einzelnen Gefäßlängen [µm] wurden addiert und anschließend durch die Fläche der ROI [µm²] geteilt.

Voraussetzung für die adäquate computergestützte Analyse der fvd und der Bestimmung der Anzahl an Gefäßverzweigungen und der Gefäßäste ist die sichere Abgrenzbarkeit der Gefäße gegenüber dem umgebenden Gewebe. Um diese zu gewährleisten, wurden die Gefäßverläufe in den unkomprimierten VSI Dateien über das Tool „Polylinie“ innerhalb der Funktion „Zählen und Messen“ der Analysesoftware Cell-Sens-Dimension in roter Farbe nachgezeichnet, wodurch eine farbliche Kontrastierung bei den anschließend im RGB-Format exportierten Bilddateien erreicht wurde (siehe Abbildung 20, Seite 45). Die so bearbeiteten Bilddateien wurden als JPG-Dateien gespeichert, um sie mittels der JAVA-basierten open source Grafikanalysesoftware Fiji (Fiji Is Just ImageJ, public domain) auswerten zu können. Hierbei wurde zunächst der rote Farbkanal isoliert, um die Dateien im Anschluss in ein binäres Farbformat zu überführen. Die so entstandenen binären Dateien wurden über das Plugin „Skeletonize“, welches die topologischen Beziehungen der Gefäßformationen abbildet, weiterverarbeitet. Diese Programmfunktion reduziert den Gefäßplexus auf das „Gefäßskelett“, wobei alle erfassten Gefäße unabhängig ihres Durchmessers als einzelne Linie erfasst werden (siehe Abbildung 19, Seite 45). Über

die Funktion „Analyze-Skeleton“ konnten nun die Anzahl der Verzweigungen und die Anzahl der Gefäßstümpfe quantifiziert werden.

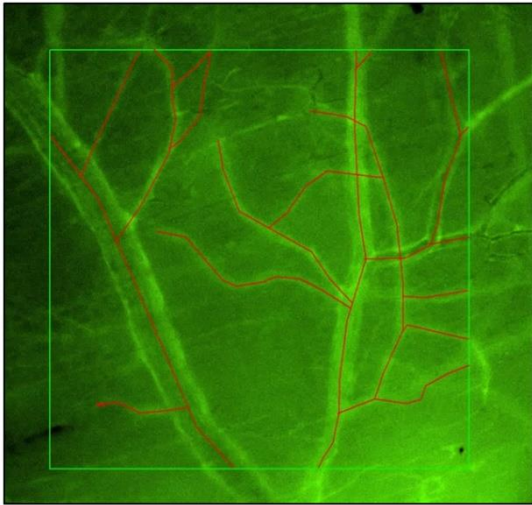


Abbildung 20: Nachzeichnung eines Gefäßplexus.

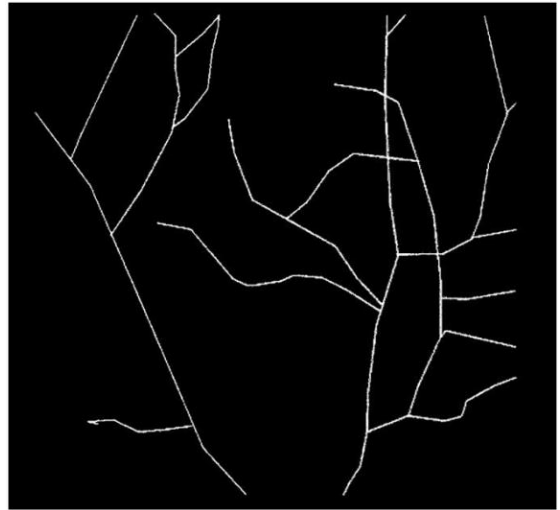


Abbildung 19: Anwendung des Plugins "Skeletonize".

Die Analyse des Gefäßplexus erfolgte nach vorheriger intravenöser Applikation von FITC-Dextran. Die Gefäßverläufe wurden verblindet nachgezeichnet und anschließend computergestützt über das Plugin „Skeletonize“ der Grafikanalysesoftware Fiji in ein binäres Gefäßskelett überführt. Abschließend erfolgte die automatisierte Auszählung der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste.

5.3.5.2 Leukozyten-Endothelinteraktion

Die Messung des Leukozytenflux erfolgte gemäß der von Eckrich et al. beschriebenen Vorgehensweise (Eckrich et al., 2021c). 30-sekündige Videosequenzen aus den ROI im Implantatlager wurden als unkomprimierte AVI-Dateien exportiert, einfach verblindet und mit dem VLC media player (VideoLAN, Paris, Frankreich) in einer Frame-by-Frame Analyse insgesamt dreimal in Folge durch eine Zweitperson beurteilt. Zunächst wurde innerhalb der ROI ein vollständig einsehbarer Gefäßabschnitt über eine Länge von 100µm markiert und der Gefäßdurchmesser nach Erstellen eines Screenshots und Exports der JPG-Datei in das Grafikprogramm FIJI durch vorherige Kalibrierung der Pixel-Längen-Ratio gemessen. Anschließend wurde die ca. 30-sekündige AVI-Datei in Normalgeschwindigkeit angeschaut und die Anzahl der adhärennten Leukozyten im ausgewählten Gefäßabschnitt gezählt. In der nun Folgenden Frame-by-Frame Analyse wurde die Anzahl der rollenden Leukozyten ermittelt. Rollende Leukozyten zeigen auf Grund einer kurzzeitigen Adhärenz an das Gefäßendothel ein deutlich abweichendes Fließverhalten im Vergleich zu den im Blutstrom befindlichen Blutzellen. Konkret wurden die Leukozyten als „rollend“ definiert, welche sich mit $\leq 1/5$ der Blutzellgeschwindigkeit an der Gefäßwand entlang fortbewegten. Im Folgenden Schritt wurde nun der Leukozytenflux im definierten Gefäßabschnitt quantifiziert. Hierzu wurden in Frame-by-Frame Analyse alle Leukozyten, welche den definierten Gefäßabschnitt durchwandern abzüglich der o.g. „rollenden“ Leukozyten gezählt. Sämtliche Messungen wurden nach vorheriger einfacher Verblindung ausgewertet.

5.3.5.3 Thrombozyten-Endothelinteraktion

Nach Transfusion der mit CFDA-SE gefärbten Thrombozyten wurde in den festgelegten ROI Gefäßabschnitte mit nachweisbarer Thrombozyten-Endothelzellinteraktion aufgesucht. Als solche Areale wurden Gefäßabschnitte definiert, in welchen fünf oder mehr Thrombozyten an der Gefäßwand aggregierten. Die Strecke der Aggregation sowie die Anzahl der Areale mit nachweisbarer Aggregation wurden nach Export des Videos mit dem VLC media player (VideoLAN, Paris, Frankreich) sowie dem JAVA-basierten open source Grafikanalysesoftware Fiji quantifiziert.

Das dargelegte Verfahren erwies sich aufgrund der zum Versuchsende eingeschränkten Darstellbarkeit der Thrombozyten im Kammerfenster als nicht suffizient umsetzbar. Es wurde daher exemplarisch eine Analyse der Thrombozyten-Endothelinteraktion 48h nach Implantation versucht. Aufgrund der durch den Versuchsantrag limitierten Tierzahl war jedoch nur eine exemplarische Versuchsdurchführung ohne quantitative Analyse umsetzbar.

5.3.5.4 Mechanische Verankerung der Implantate im Gewebe

Die dynamische Desintegrationskraft bezeichnet die zur Luxation des Implantatkörpers aus dem Implantatlager aufzubringende Kraft. Die dynamische Desintegrationskraft wurde unmittelbar nach dem Tod des Versuchstieres ermittelt. Nach dem Fixieren des Versuchstierkadavers und zusätzlicher Immobilisation der Kammer durch eine mit Schrauben arretierte Plexiglasplatte, wurde die Mikroskopieplatte fest auf einem manuell in der Höhe verstellbaren Hubtisch platziert. Anschließend wurde das Kammerfenster durch Entfernung des Sprengringes eröffnet. Im oberen Randbereich des Implantates wurde anschließend ein Polyamidfaden (Ethilon® 8-0, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA) mit der Nadel durch eine der Implantatporen (vornehmlich in der linken oberen Ecke des Implantates) geführt und durch das Knüpfen von fünf antagonistischen chirurgischen Knoten mit dem gegensätzlichen Fadenende zu einer Schlaufe verbunden. Die Schlaufe wurde nun vorsichtig in eine, an einem Metallgalgen senkrecht oberhalb des Kammerfensters arretierte 3N Präzisions-Federwaage (PESOLA Präzisionswaagen AG, Schindellegi, Schweiz) eingehängt. Der Faden wurde vorsichtig auf Spannung gebracht ($<0,05\text{N}$) und die Hochfrequenzkamera (GoPro® HERO5 Black, GoPro Inc., San Mateo, Kalifornien, USA) vor der Messskala der Federwaage platziert. Nach regelrechter Ausrichtung sämtlicher Komponenten wurde Aufnahme mit 120fps bei 1080p gestartet. Ein akustisches Signal signalisierte den Beginn der Messung. Nachfolgend wurde der Hubtisch manuell gleichmäßig abgesenkt. Über die Videoaufnahme wurde sowohl die maximal ausgeübte Kraft vor Luxation des Implantates über die Messskala der Federwaage erfasst als auch die Zeit bis zur Luxation festgehalten (siehe Abbildung 21, Seite 47). Die Videoanalyse erfolgte nach der Überspielung der Daten auf einen Computer mit der Software VLC media player (VideoLAN, Paris, Frankreich).

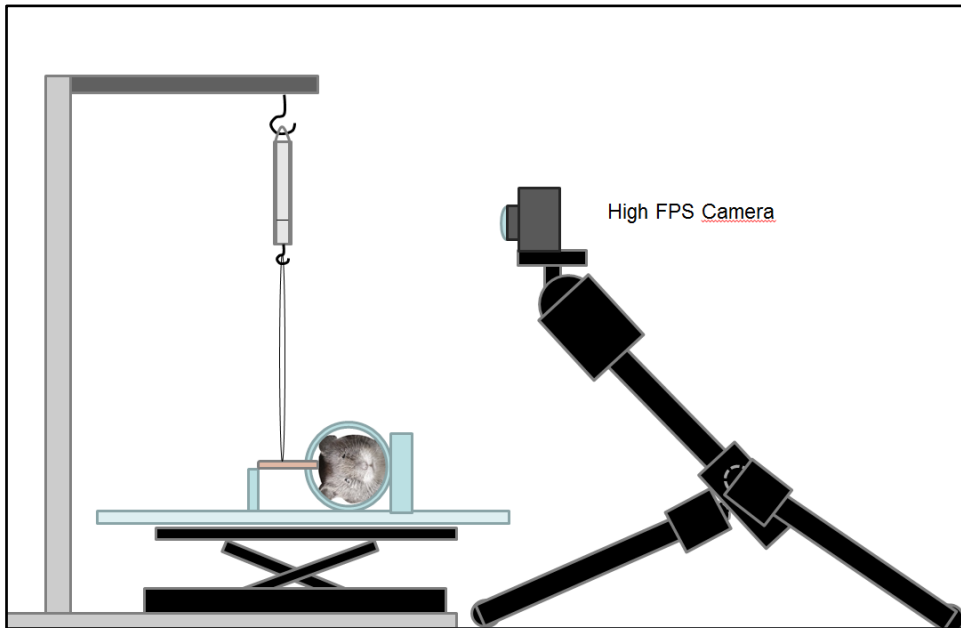


Abbildung 21: Ermittlung der Dynamischen Desintegrationskraft.

Nach cervikaler Dislokation erfolgt die Fixierung der Rückenhautkammer und des Versuchstierkadavers auf einer Plexiglasplatte. Die Plexiglasplatte befindet sich auf einem mechanischen Hubtisch. Das PPE-Implantat ist über einen chirurgischen Faden mit einer Federwaage verbunden. Über die Senkung des Hubtisches wird Zugkraft auf das Implantat bis zu dessen Luxation aufgebracht. Die Ermittlung der über die Zeit aufgebrachten Zugkraft erfolgt über die Federwaage, die während des Messvorgangs durch die High FPS Kamera aufgezeichnet wird.

5.3.6 Histologische Fixierung

Der zur Bestimmung der Desintegrationskraft eingebrachte Faden wurde aus dem Implantat entfernt und die Implantate zunächst nach Formalinfixierung in 4% Formalinlösung in Paraffin (Roti® Plast, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Nach Umbettung der Proben in Paraffin (Roti® Plast, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden die fixierten Präparate mit dem Mikrotom (Leica CM1900, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) in 5µm messende Gewebeschnitte aufgetrennt und anschließend spezifisch gefärbt.

5.3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Entparaffinierung wurde wie folgt durchgeführt: Nachdem ein Präparat in Xylol-lösung absteigender Konzentration (100%, 90%, 80%, 70%) gestellt worden ist, wurde es für 5min in vollentsalztes Wasser überführt. Anschließend erfolgte die Färbung für 5min in saurer Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Danach schloss sich das Bläuen für 10min unter fließendem Leitungswasser an. Nach erneutem Überführen der Probe für 2min in vollentsalztes Wasser erfolgte der nächste Färbeschritt für 3min in 0,5% Eosinlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Nach erneutem Spülen unter Leitungswasser wurde in Isopropanollösung aufsteigender Konzentration (2min in 80% Isopropanol, 2min in 90% Isopropanol und 3 min in 100 % Isopropanol) sowie für zweimal 5min in 100% Xylol entwässert. Abschließend folgte das Eindecken des

Schnittpräparates mit Eukitt® Einschlusmittel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

5.4 Versuch 2: *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*

Die im Folgenden beschriebene Präparation der *in ovo*-Variante des CAM Assay entspricht dem von Buhr et al. und Eckrich et al. beschriebenen Vorgehen (Buhr et al., 2020, Eckrich et al., 2020).

Befruchtete Eier des White-Leghorn-Huhns wurden nach Anlieferung durch den Züchter (LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH & Co.KG, Dieburg, Deutschland) am ersten Tag nach Befruchtung sorgfältig mit destilliertem Wasser von Verschmutzungen gereinigt und anschließend in Seitenlage bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ im Bebrüter (Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg, Deutschland) für 72h inkubiert.

Nach 72h ohne Intervention wurden jeweils 6ml Eiweiß mittels einer 20G Kanüle (Sterican®, BRAUN, Kronberg im Taunus, Deutschland) durch die Eierschale abpunktiert. Anschließend wurde die Eierschale oberhalb der Luftblase mit der Präparierschere eröffnet und die CAM exponiert (siehe Abbildung 22). Nichtbefruchtete Eier wurden aussortiert und während des gesamten folgenden Beobachtungszeitraums wurden täglich optische Kontrollen der Viabilität des Hühnerembryos vorgenommen. Um ein Austrocknen der CAM zu verhindern, wurde die Öffnung der Eierschale täglich mit zurechtgeschnittenem Parafilm® „M“ (Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA) luftdicht verschlossen.

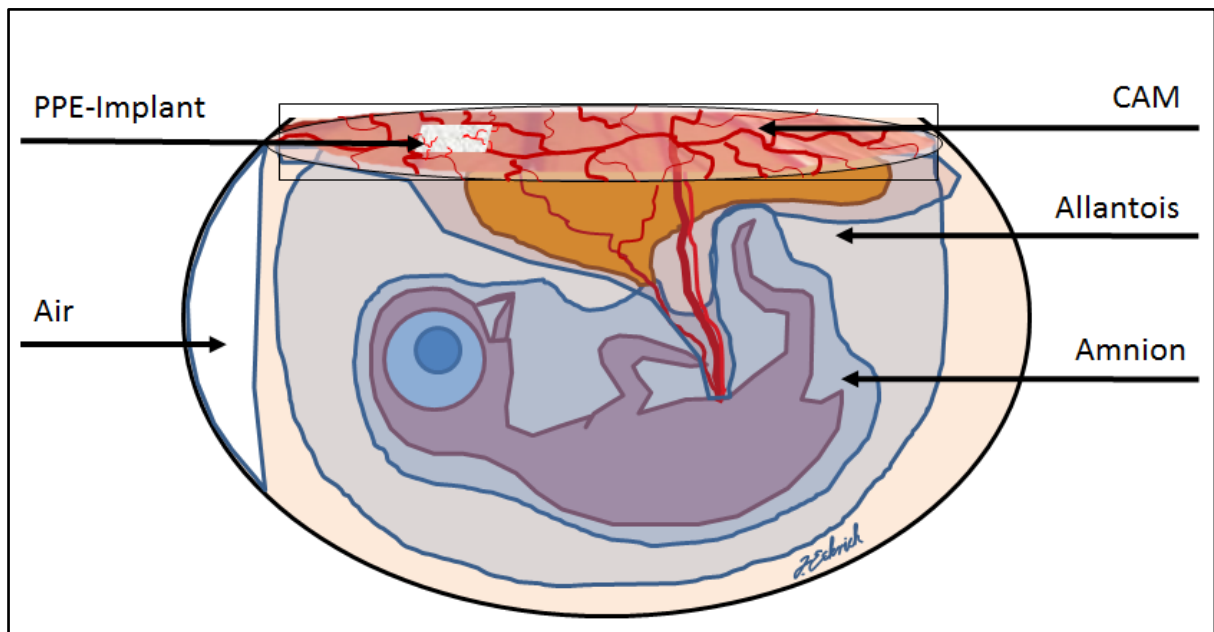


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines PPE-Implantates auf der Chorioallantoismembran.

Das PPE-Implantat wurde zentral auf die exponierte Chorionallantoismembran (CAM) aufgebracht. Veranschaulicht werden zudem die Lagebeziehung der CAM zu Embryo, Dottersack, Allantois und Amnion.

24h nach öffnen des Eis erfolgte die Auflage der PPE-Implantate auf die CAM. Diese wurden randomisiert einer der vier Versuchsgruppen zugeordnet und entsprechend des oben genannten Versuchsprotokolls modifiziert.

Am Tag der Implantation, der als Tag 1 gezählt wurde, sowie an den Tagen 7 und 10 wurden Übersichtsaufnahmen der Implantate erstellt. An den Beobachtungstagen 7 und 10 wurden zusätzlich das Implantatlager mikroskopisch dargestellt und fotografiert.

Nach Versuchsabschluss an Beobachtungstag 10 wurde der Embryo *in ovo* dekapitiert. Die CAM wurde mitsamt dem eingebetteten PPE-Implantat im Abstand von 2 ± 1 mm mit der spitzen Präparierschere chirurgisch ausgelöst, nach Überführung in 0,9%-NaCl Lösung auf einem Papierträger ausgebreitet und nach Einschluss in eine PU-Kassette in 4% Formalinlösung fixiert.

5.4.1 Intravitalmikroskopie

Unmittelbar nach Aufbringung der PPE-Implantate auf die CAM, also an Versuchstag 1, wurden Aufnahmen der Implantatoberfläche in 40facher Vergrößerung mit einem Intravitalmikroskop (Olympus BXFM-Intravitalmikroskop, Olympus Europa SE&Co.KG, 20097 Hamburg, Deutschland) angefertigt.

An den Versuchstagen 7 und 10 wurden die Versuchsobjekte auf einer Halterung fixiert, die sich auf einem X-Y-Präzisionstisch befand. In 40facher Vergrößerung wurden Einzelaufnahmen des dem Implantat anliegenden Gewebes zu jeder Seite sowie des Implantates angefertigt. Die Aufnahmen wurden mit Metadaten (VSI-files) sowie ohne Metadaten (JPG-Files) gespeichert.

Es wurden 5 ROI definiert. Hierbei decken vier ROIs das Implantatlager ab, sind jeweils quadratisch mit einer Einzelfläche von 1mm^2 und liegen den Seitenrändern des Implantates unmittelbar mittig an. Die fünfte ROI deckt das Implantat vollständig ab, was aufgrund der Flächengröße die Anfertigung überlappender Einzelaufnahmen erforderlich machte (siehe Abbildung 23, Seite 50).

5.4.2 Bildanalyse

5.4.2.1 Gefäßparameter im CAM Assay

Die Bildanalyse erfolgte analog dem Vorgehen hinsichtlich der Gefäßnetzanalyse in der DSC. Die Messung der Gefäßlängen innerhalb der als ROI festgelegten Bildabschnitte wurde mit unkomprimierten VSI-Dateien durchgeführt. Unter Einbeziehung der Metadaten konnten Gefäßlängen direkt mittels der Analysesoftware Cell-Sens-Dimension (Olympus Europa SE&Co.KG, 20097 Hamburg, Deutschland) bestimmt werden. Für die Messung wurden die perfundierten Gefäße innerhalb jedes ROI digital nachgezeichnet.

Die Ergebnisse der Messung wurden in dem Microsoft Excel proprietären Dateiformat „xls“ exportiert. Die einzelnen Gefäßlängen [μm] wurden addiert und anschließend durch die ROI-Fläche [μm^2] geteilt, um die fvd zu berechnen.

Die weitere Analyse der Gefäßparameter erfolgte homolog zum Protokoll der DSC (siehe oben).

Dementsprechend wurden die Blutgefäße in den unkomprimierten VSI Dateien über das Tool „Polylinie“ innerhalb der Funktion „Zählen und Messen“ der Analysesoftware Cell-Sens-Dimension in roter Farbe nachgezeichnet, wodurch eine deutliche Kontrastierung erreicht wurde. Die so bearbeiteten Bilddateien wurden als JPG-Dateien gespeichert, um sie mittels der JAVA-basierten open source Grafikanalysesoftware Fiji auswerten zu können. Hierbei wurde zunächst der rote Farbkanal isoliert, um die Dateien im Anschluss in ein Bild mit binärem Farbspektrum konvertieren zu können. Die so entstandenen binären Dateien wurden über das Plugin

„Skeletonize“, welches die topologischen Beziehungen der Gefäßformationen abbildet, weiterverarbeitet. Über die Funktion „Analyze-Skeleton“ konnten nun die Anzahl der Verzweigungen und die Anzahl der Gefäßäste quantifiziert werden.

5.4.2.2 Qualitative Auswertung der Integrationsgrade der eingebrachten Implantate aus porösem Polyethylen

Aufgrund der kontinuierlichen Bewegungen des Hühnerembryos und der damit bei der Anfertigung von Serienaufnahmen auftretenden Entfernung des Implantates aus der Fokusebene erwies sich in der Versuchsplanung die Erstellung eines MIA als nicht sinnvoll. Über das Plugin „Stitching“ der Grafikanalysesoftware Fiji wurden daher die an den Beobachtungstagen 1, 7 und 10 angefertigten Einzelaufnahmen der Implantate verknüpft. Auf diesem Weg konnte eine komplette Übersichtsaufnahme des Implantates erzeugt werden und dabei die adäquate Fokusebene eingehalten werden (Abbildung 23).

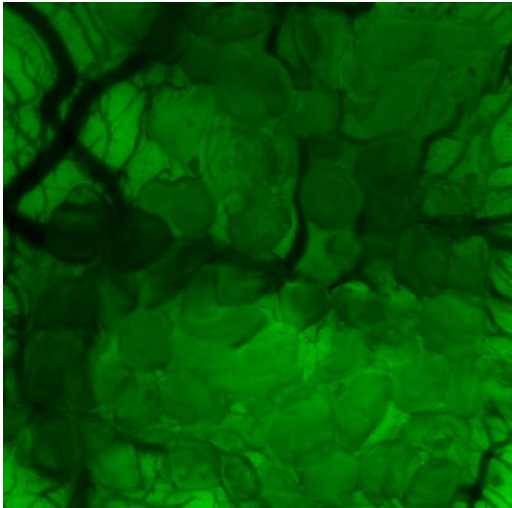


Abbildung 23: Konstruierte Übersichtsaufnahme eines PPE-Implantates auf der Chorioallantoismembran.

Aus vier Einzelaufnahmen wurde über das Plugin „Stitching“ der Grafikanalyse-Software Fiji eine zusammengesetzte Übersichtsaufnahme eines der Chorioallantoismembran aufliegenden PPE-Implantates erstellt.

Die Analyse der Implantatintegration im CAM Assay erfolgte qualitativ und verblindet. Hierfür wurden die an den Beobachtungstagen 7 und 10 angefertigten Übersichtsaufnahmen der Implantate herangezogen.

In der Literatur werden das Auftreten radiärer, zum Stimulus ausgerichteter vaskulärer Netze sowie eine Zunahme der Durchmesser der angrenzenden Gefäße und eine Erhöhung der Dichte der vaskulären Netzwerke im CAM Assay als Hinweis auf eine positive Beeinflussung der Angiogenese durch den Stimulus betrachtet (Ribatti, 2017). Auf dieser Grundlage wurde ein fünfgliedriges Bewertungssystem entworfen, um die Qualität der Implantatintegration der PPE-Implantate zu beschreiben und diese miteinander vergleichen zu können (siehe Abbildung 24, Seite 51).

Integrationsgrad	Kriterien
I	weder in der direkten Umgebung des Implantates noch in den Poren des Implantates zeigt sich eine Veränderung der Vaskularisation im Vergleich zur umgebenden CAM
II	radiär zum Implantat ausgerichtete Gefäße oder subjektiv erhöhte Gefäßdichte oder subjektiv erhöhte Gefäßdurchmesser in den Poren
III	zwei der drei Vaskularisationseigenschaften sind erfüllt
IV	alle Vaskularisationseigenschaften sind erfüllt, es zeigt sich keine Überlappung des Implantatkörpers durch einzelne Gefäße
V	es zeigen sich Überlappungen des Implantatkörpers durch einzelne Gefäße, die Gefäße sind radiär zum Implantat hin ausgerichtet, die Dichte und der Durchmesser der in den Poren der Implantatkörper einsehbaren vaskulären Netze erscheint vergrößert

Abbildung 24: CAM Assay: Systematik der qualitativen Analyse der Implantat-Integration.

5.5 Biometrie und Statistik

Die fvd, die Anzahl der Gefäßverzweigungen, die Anzahl der Gefäßäste sowie die Parameter der Leukozyten-Endothelinteraktion sind unabhängige, stetige Merkmale und damit quantitativ analysierbar.

Mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests wurden die einzelnen Datensätze auf Normalverteilung überprüft (Berger and Zhou, 2014).

Zum Vergleich zwischen zwei normalverteilten Datensätzen wurde der Zweistichproben-t-Test als parametrischer Test angewandt (Falk et al., 2014). Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ein nicht-parametrischer Test eingesetzt, mit dem sich überprüfen lässt, ob zwei unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (McKnight and Najab, 2010). Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf 0,05 festgelegt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse (engl. one-way ANOVA) ermöglicht den Vergleich von zwei oder mehr Datensätzen. Mit ihr lässt sich zeigen, ob sich mindestens eine der Versuchsgruppen statistisch signifikant von den anderen Versuchsgruppen unterscheidet (Kim, 2017b). Bei Vorlage eines signifikanten Ergebnisses wurde eine

post-hoc Analyse mittels des Tukey-HSD durchgeführt. Dieser Test ermöglicht über paarweise Vergleiche der Versuchsgruppen, die Identifikation der Versuchsgruppen, die sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Abdi and Williams, 2010). Das Signifikanzniveau wurde für die einfaktorielle Varianzanalyse und den Tukey-HSD auf 0,05 festgelegt.

Um die Integration der PPE-Implantate im CAM Assay auszuwerten, wurden den an den Beobachtungstagen 7 und 10 erstellten Übersichtsaufnahmen der Implantate ordinalskalierte Kategorien zugewiesen. Die Analyse der Integrationsgrade erfolgte dann mittels Kruskal-Wallis-Test (Ostertagova et al., 2014).

Die Auswertbarkeit der einzelnen Versuchsgruppen im CAM Assay wurde dichotom vermerkt und mittels des exakten Tests nach Fisher analysiert (Kim, 2017a).

6 Ergebnisse

6.1 Versuch 1: Modell der transparenten Rückenhautkammer:

Im Rückenhautkammermodell wurden die fvd, die Anzahl der Gefäßverzweigungen, die Anzahl der Gefäßäste, die Leukozyten-Endothelinteraktion in Implantat und Implantatlager und die aufzubringende dynamische Desintegrationskraft zur Luxation des PPE-Implantates quantitativ analysiert. Ferner wurde die nach Applikation CFDA-SE markierter Thrombozyten die Darstellbarkeit aggregierender Thrombozyten im Implantatlager untersucht.

6.1.1 Gefäßparameter

6.1.1.1 Funktionelle Gefäßdichte im Implantat

Die fvd im Implantat wurde an den Beobachtungstagen 10, 12 und 14 evaluiert. In beiden Versuchsgruppen zeigt sich ein Anstieg der fvd über die Beobachtungstage, der im Folgenden beschrieben wird.

Die fvd-Datensätze zeigen sich mit Ausnahme der im Wildtyp an Beobachtungstag 14 erhobenen Werte im Komogorow-Smirnow-Test nicht normalverteilt.

In der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe können in 3 von 8 Mäusen an Tag 10 Gefäße im Implantat nachgewiesen werden, während dies in der Kontrollgruppe bei 7 von 8 Mäusen gelingt. Der Median in der TSP-1-Versuchsgruppe ist dementsprechend an Beobachtungstag 10 $0,00\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 1,46\text{mm}^{-1}$), der Median in der Kontrollgruppe ist $0,15\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 2,34\text{mm}^{-1}$).

An Tag 12 lassen sich in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe in 6 von 8 Tieren und im Wildtyp in 7 von 8 Tieren Blutgefäße im Implantat nachweisen. Der Median in der K.O.-Gruppe beträgt an Tag 12 $0,06\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 2,50\text{mm}^{-1}$), in der Kontrollgruppe liegt der Median an Tag 12 bei $0,37\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 4,70\text{mm}^{-1}$).

An Beobachtungstag 14 schließlich sind in 7 von 8 TSP-1-defizienten Mäusen Blutgefäße im Implantat nachweisbar, in der Kontrollgruppe ist das nun in allen Tieren der Fall. Der mediane Wert der fvd in der Kontrollgruppe beträgt $1,93\text{mm}^{-1}$ ($0,22 - 4,89\text{mm}^{-1}$). Der Median in der K.O.-Gruppe beträgt an Tag 14 $0,31\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 3,82\text{mm}^{-1}$).

Der beschriebene Anstieg in der fvd im Implantat von Beobachtungstag 10 auf 14 fällt in der Kontrollgruppe signifikant stärker aus als in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe. Der Mann-Whitney-U-Test ergibt einen P-Wert von 0,0379, die fvd-Inkrementen haben in der TSP-1-defizienten Kohorte einen medianen Wert von $0,31\text{mm}^{-1}$ ($0,00 - 2,36\text{mm}^{-1}$) sowie von $1,24\text{mm}^{-1}$ ($0,22 - 2,68\text{mm}^{-1}$) in der Kontrollgruppe. Vergleicht man die fvd-Werte zwischen beiden Versuchsgruppen für die Beobachtungstage 10, 12 und 14 einzeln, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

fvd im Implantat

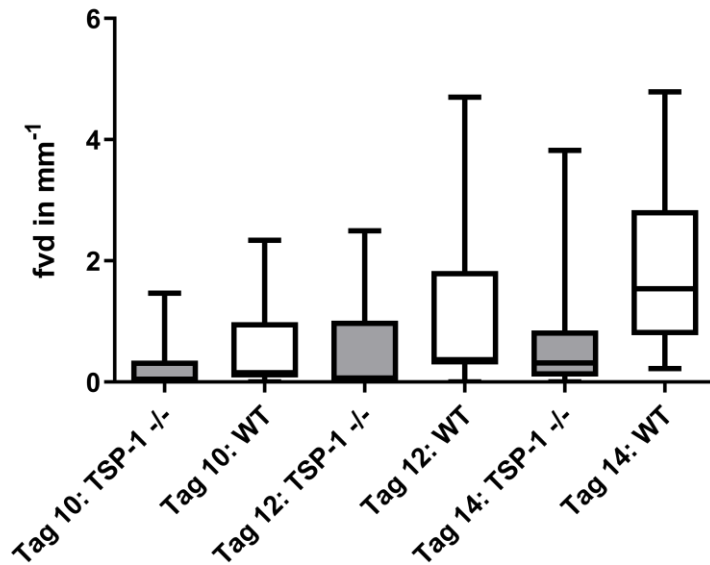


Abbildung 25: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantat.

Die fvd-Werte [mm⁻¹] im Implantat wurden an den Beobachtungstagen 10, 12 und 14 ermittelt. Die Whisker zeigen minimale und maximale Werte an, der querverlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 -/- (N=8), WT (N=8).

Änderung der fvd im Implantat

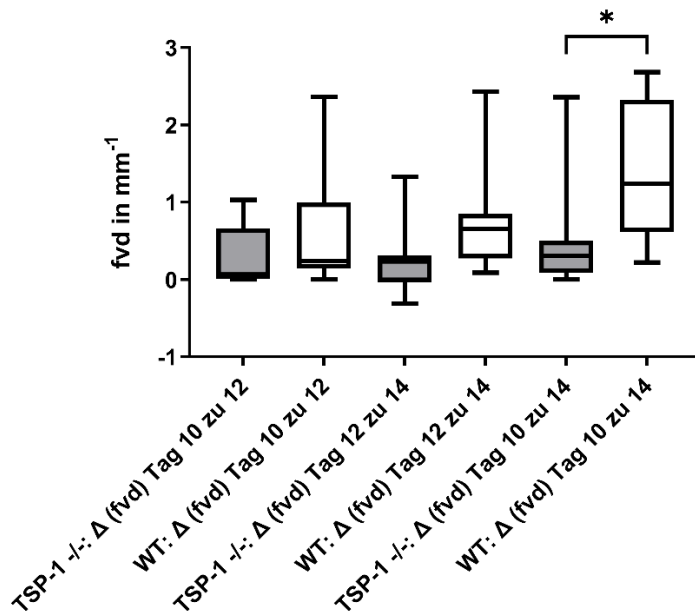


Abbildung 26: Boxplots der Änderung der funktionellen Gefäßdichte im Implantat.

Von links nach rechts sind die Änderungen der fvd-Werte [mm⁻¹] im Implantat von Beobachtungstag 10 auf 12, von Beobachtungstag 12 auf 14 sowie von Beobachtungstag 10 auf 14 aufgetragen. Die Whisker zeigen minimale und maximale Werte an, der querverlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 -/- (N=8), WT (N=8). P-Wert = 0,0379.

6.1.1.2 Funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager

Die funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager wurde an den Beobachtungstagen 3, 7 und 10 evaluiert. In beiden Versuchsgruppen zeigt sich ein Anstieg der fvd in den an das PPE- Implantat angrenzenden ROIs. Im Kolmogorow-Smirnow-Test zeigen sich alle Datensätze normalverteilt.

In der TSP-1-Gruppe zeigt sich an Tag 3 ein Mittelwert von $5,09\text{mm}^{-1}$ ($3,42 - 6,30\text{mm}^{-1}$), an Tag 7 ein Mittelwert von $6,29\text{mm}^{-1}$ ($4,61 - 7,94\text{mm}^{-1}$) sowie an Tag 10 ein Mittelwert von $6,76\text{mm}^{-1}$ ($5,68 - 7,85\text{mm}^{-1}$).

In der Kontrollgruppe beträgt der Mittelwert der fvd im Implantatlager an Tag 3 $5,14\text{mm}^{-1}$ ($2,99 - 8,06\text{mm}^{-1}$), an Tag 7 $6,78\text{mm}^{-1}$ ($3,45 - 11,94\text{mm}^{-1}$) und an Tag 10 $7,91\text{mm}^{-1}$ ($3,80 - 12,48\text{mm}^{-1}$).

Es treten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen TSP-1-defizienter Versuchsgruppe und Kontrollgruppe hinsichtlich der fvd im Implantatlager auf.

fvd im Implantatlager

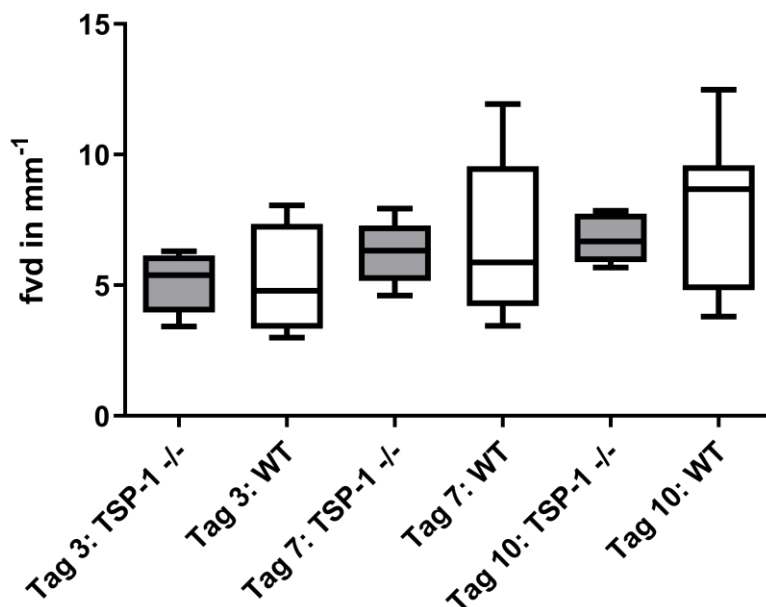


Abbildung 27: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager.

Die fvd-Werte [mm^{-1}] im Implantatlager wurden an den Beobachtungstagen 3, 7 und 10 bestimmt. Die Whisker zeigen minimale und maximale Werte an, der querverlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 -/- (N=8), WT (N=8).

6.1.2 Gefäßverzweigungen und Gefäßäste

6.1.2.1 Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat

Die Anzahl der Gefäßäste und Gefäßverzweigungen im Implantat wurde an den Beobachtungstagen 10, 12 und 14 ermittelt.

In der TSP-1-defizienten Gruppe sowie in der Kontrollgruppe zeigt sich ein Anstieg der Anzahl der Gefäßverzweigungen und der Gefäßäste im Implantat.

Die Datensätze zeigen sich bis auf die an Beobachtungstag 14 im Wildtyp gemessenen Werte im Kolmogorow-Smirnow-Test nicht normalverteilt.

Hinsichtlich der Anzahl der Gefäßäste ergibt sich in der TSP-1-defizienten Gruppe für Tag 10 als Median 0,00 Gefäßästen pro Implantat (0,00 – 78,40), an Tag 12 ein Median von 5,14 Gefäßästen pro Implantat (0,00 – 161,63) und schließlich für Tag 14 ein Median von 15,39 Gefäßästen pro Implantat (0,00 – 178,08). In der Kontrollgruppe beträgt der Median der Anzahl der Gefäßäste pro Implantat an Tag 10 6,80 (0,00 – 115,43) sowie an Tag 12 23,94 (0,00 – 326,96). An Beobachtungstag 14 ergibt sich bei normalverteilten Einzelwerten ein Median von 115,68 Gefäßästen pro Implantat (10,31 – 483,74).

Die Anzahl der Gefäßverzweigungen weist in der TSP-1-defizienten Gruppe an Tag 10 einen Median von 0,00 (0,00 – 35,86), an Tag 12 einen Median von 1,15 (0,00 – 70,96) sowie an Tag 14 einen Median von 5,18 (0,00 – 87,08) auf. In der Kontrollgruppe ergeben sich die folgenden Mediane der Anzahl an Gefäßverzweigungen im Implantat: an Tag 10 2,17 (0,00 – 49,64) und an Tag 12 9,86 (0,00 – 168,43). Der Median der Anzahl an Gefäßverzweigungen pro Implantat an Tag 14 beträgt 50,37 (3,44 – 228,28).

An den Beobachtungstagen 10 und 12 treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf.

An Beobachtungstag 14 sind dagegen sowohl die Anzahl der Gefäßverzweigungen (Mann-Whitney-U-Test, P-Wert = 0,0368) als auch die Anzahl der Gefäßäste (Mann-Whitney-U-Test, P-Wert = 0,0379) im Implantat im Wildtyp signifikant erhöht gegenüber den TSP-1-defizienten Mäusen.

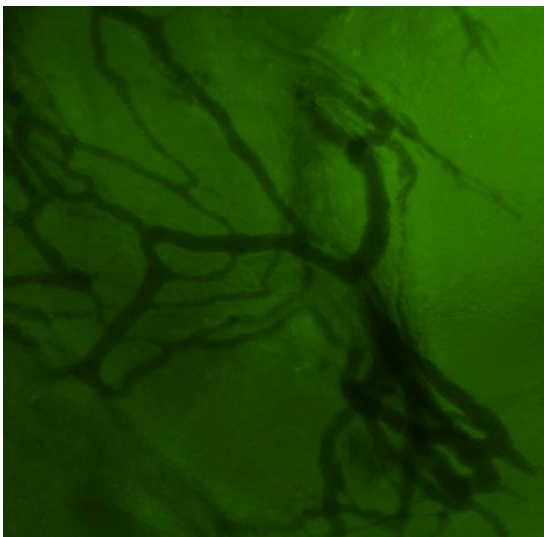


Abbildung 28: Gefäßplexus im Implantat an Versuchstag 14.

Die Abbildung wurde an Versuchstag 14 vor der intravenösen Applikation von FITC-Dextran aufgenommen. Es handelt sich um ein Versuchstier aus der Kontrollgruppe. Das Gefäßwachstum orientiert sich an den Implantatporen.

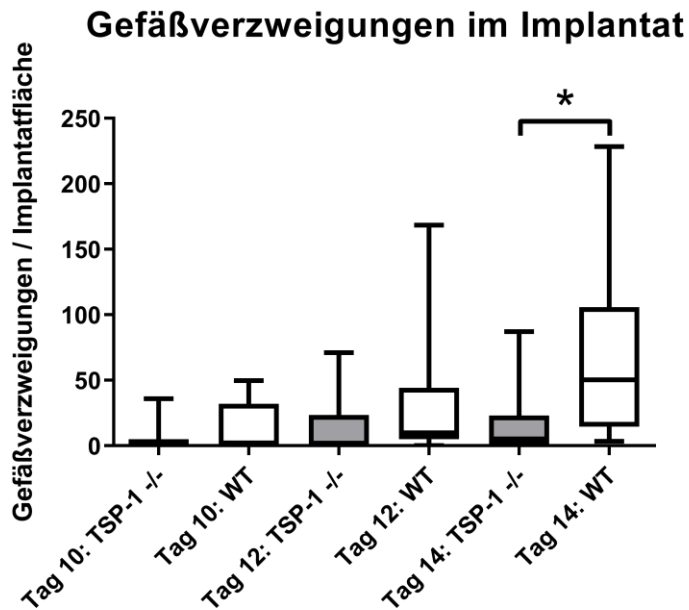


Abbildung 29: Boxplots der Gefäßverzweigungen im Implantat.

Die Anzahl der Gefäßverzweigungen pro Implantatfläche wurde an den Beobachtungstagen 10, 12 und 14 bestimmt. Die Whisker zeigen minimale und maximale Werte an, der querverlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 -/- (N=8), WT (N=8). P-Wert = 0,0368.

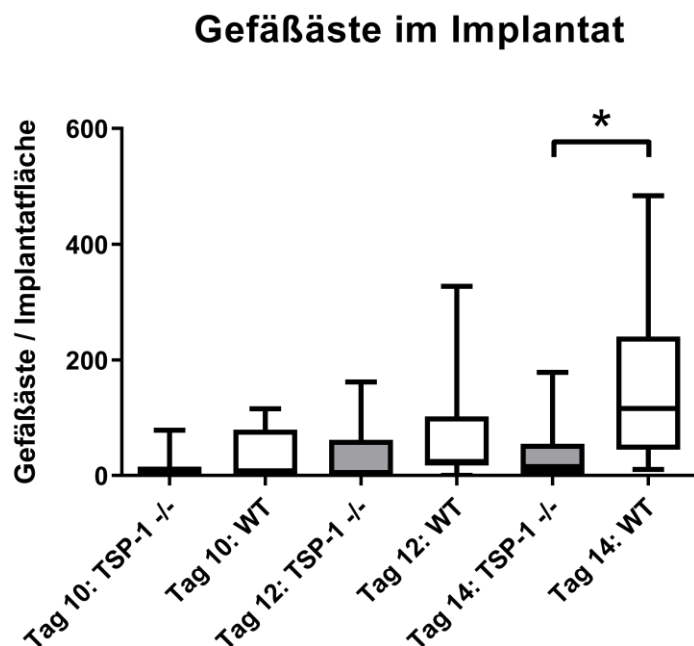


Abbildung 30: Boxplots der Gefäßäste im Implantat.

Die Anzahl der Gefäßäste pro Implantatfläche wurde an den Beobachtungstagen 10, 12 und 14 ermittelt. Die Whisker zeigen minimale und maximale Werte an, der querverlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 -/- (N=8), WT (N=8). P-Wert = 0,0379.

6.1.2.2 Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager

Die Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste pro ROI wurde im Implantatlager analog zur fvd an den Beobachtungstagen 3, 7 und 10 bestimmt. Die erhobenen Datensätze sind in beiden Gruppen normalverteilt.

An Beobachtungstag 3 zeigt sich in den TSP-1-defizienten Mäusen ein Mittelwert von 11,15 Gefäßverzweigungen pro ROI (6,00 – 18,75) und von 22,61 Gefäßästen pro ROI (12,90 – 34,25). Demgegenüber liegt im Wildtyp an Beobachtungstag 3 der Mittelwert bei 13,89 Gefäßverzweigungen pro ROI (2,38 – 30,91) und bei 28,41 Gefäßästen pro ROI (5,75 – 57,09).

Sowohl in den TSP-1-defizienten Mäusen als auch im Wildtyp war an Beobachtungstag 7 eine Steigerung beider Werte nachzuvollziehen. In der Versuchsgruppe stieg die Zahl der Gefäßverzweigungen pro ROI im Mittel auf 18,22 (9,33 – 28,50) und die der Gefäßäste pro ROI auf 35,36 (19,38 – 54,50). In der Kontrollgruppe zeigte sich an Beobachtungstag 7 der Mittelwert bei 24,47 Gefäßverzweigungen pro ROI (4,20 – 60,64) und bei 46,76 Gefäßästen pro ROI (10,20 - 104,82).

An Beobachtungstag 10 zeigte sich in den TSP-1-defizienten Mäusen ein Mittelwert von 20,92 Gefäßverzweigungen pro ROI (14,67 – 28,75) und von 40,64 Gefäßästen pro ROI (28,17 – 54,00). In der Kontrollgruppe betragen die Mittelwerte der Gefäßverzweigungen pro ROI 30,88 (6,40 – 64,29) und der Gefäßäste pro ROI 60,69 (14,25 – 109,12).

Zusammengefasst traten im Implantatlager zwischen der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Gefäßverzweigungen und der Anzahl der Gefäßäste pro ROI auf. Auffällig ist im Vergleich beider Gruppen die größere Streubreite der Werte im Wildtyp.

Gefäßverzweigungen im Implantatlager

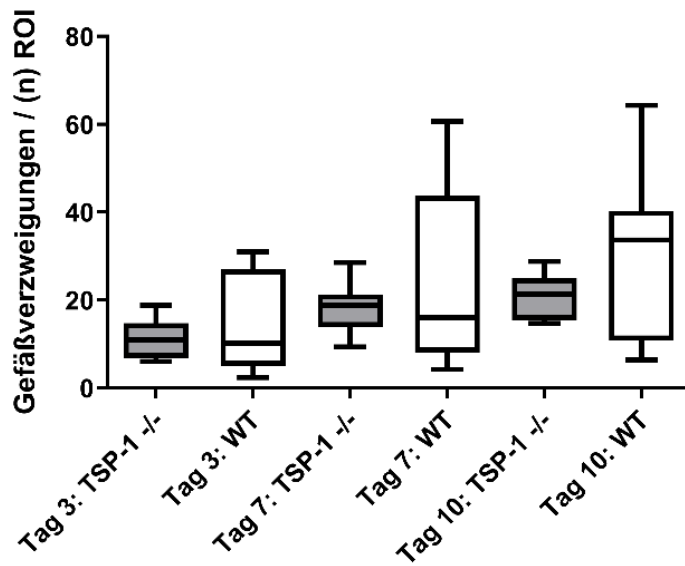


Abbildung 31: Boxplots der Gefäßverzweigungen im Implantatlager.

Die Anzahl der Gefäßverzweigungen pro ROI im Implantatlager wurde in der DSC an den Versuchstagen 3, 7 und 10 ermittelt. Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 -/- (N=8) und WT (N=8).

Gefäßäste im Implantatlager

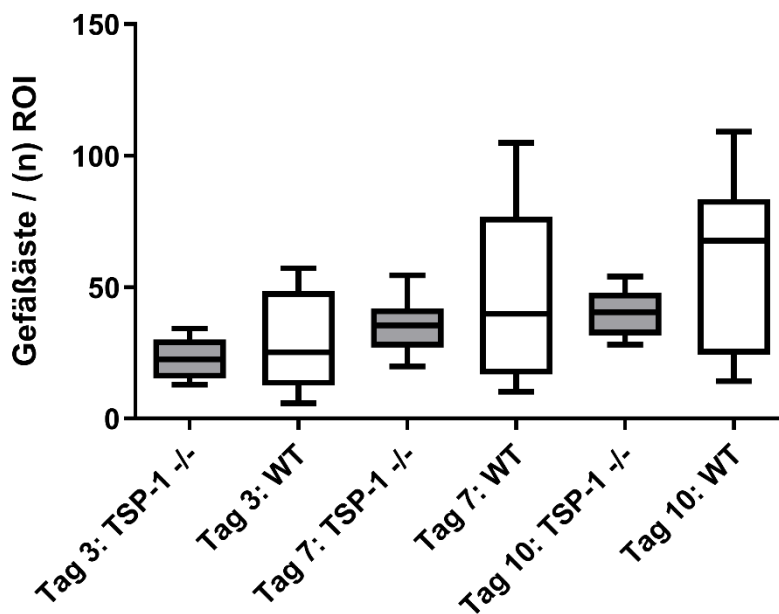


Abbildung 32: Boxplots der Gefäßäste im Implantatlager.

Die Anzahl der Gefäßäste pro ROI im Implantatlager wurde in der DSC an den Versuchstagen 3, 7 und 10 ermittelt. Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 -/- (N=8) und WT (N=8).

6.1.2.3 Leukozyten-Endothelinteraktion

Die Leukozyten-Endothelinteraktion wurde an den Beobachtungstagen 3, 7 und 10 im Implantatlager untersucht.

Die Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten setzt sich aus den Fraktionen der statischen, der rollenden und der sich im Blutstrom befindlichen Leukozyten zusammen. Da die der Auswertung zugrundeliegenden Videosequenzen um wenige Sekunden in ihrer Länge variieren, wird die intravaskuläre Leukozytenzahl pro Zeit [s^{-1}] angegeben. Im Folgenden sind jeweils die Mediane sowie in Klammern der minimale und maximale Wert angegeben.

An Beobachtungstag 3 bewegt sich die intravaskuläre Leukozytenzahl pro Zeit in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe mit einem Median von $1,66s^{-1}$ ($0,38 - 3,13s^{-1}$) auf ähnlichem Niveau wie in der Kontrollgruppe, die einen Median von $1,96s^{-1}$ ($0,29 - 4,11s^{-1}$) aufweist.

An Beobachtungstag 7 ist die intravaskuläre Leukozytenzahl pro Zeit in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe mit einem medianen Wert von $1,59s^{-1}$ ($0,58 - 4,40s^{-1}$) gegenüber der Kontrollgruppe mit $0,96s^{-1}$ ($0,39 - 2,66s^{-1}$) signifikant erhöht. Mittels Mann-Whitney U-Test wird ein P-Wert von 0,0038 ermittelt.

Diese Erhöhung der intravaskulären Leukozytenzahl pro Zeit in den K.O.-Tieren gegenüber der Kontrollgruppe ist an Beobachtungstag 10 noch beständig, allerdings ohne statistische Signifikanz aufzuweisen. Der Median der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe ist $1,10s^{-1}$ ($0,24 - 3,53s^{-1}$) gegenüber $0,96s^{-1}$ ($0,29 - 1,82s^{-1}$) in der Kontrollgruppe.

Betrachtet man das Verhältnis der einzelnen Fraktionen der intravaskulären Leukozyten zu deren Gesamtzahl und vergleicht diese zwischen den beiden Kohorten ergeben sich die im folgenden beschriebenen Beobachtungen.

An Versuchstag 3 ist der Anteil der rollenden und statischen Leukozyten an der Zahl der intravaskulären Leukozyten in den K.O.-Tieren mit einem Median von 0,09 ($0,00 - 0,59$) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, die einen Median von 0,33 ($0,00 - 0,61$) aufweist, erniedrigt. Im Mann-Whitney U-Test wird ein P-Wert von 0,0105 ausgegeben. Fokussiert man den Anteil der statischen Leukozyten an der intravaskulären Leukozytenzahl an Tag 3, so ist der Unterschied hochsignifikant. Die TSP-1-defiziente Versuchsgruppe weist einen Median von 0,00 ($0,00 - 0,22$) gegenüber einem medianen Wert von 0,04 ($0,00 - 0,21$) im Wildtyp auf. Mittels Mann-Whitney U-Test ergibt sich ein P-Wert von 0,0005.

An Versuchstag 7 nimmt der Anteil der rollenden und statischen Leukozyten an den Gesamtleukozyten im Vergleich zu Tag 3 leicht ab und liegt in beiden Kohorten auf ähnlichem Niveau. In der Knockout-Kohorte beträgt der Median 0,15 ($0,00 - 0,48$) gegenüber 0,19 ($0,00 - 0,72$) in der Kontrollgruppe. Vergleichbar verhält es sich mit dem Anteil der statischen Leukozyten an der Zahl der intravaskulären Leukozyten an Tag 7, hier wird in den TSP-1-defizienten Tieren ein medianer Wert von 0,02 ($0,00 - 0,36$) gegenüber einem Median von 0,03 ($0,00 - 0,22$) im Wildtyp ermittelt.

An Beobachtungstag 10 schließlich setzt sich der Rückgang des Anteils der rollenden und statischen Leukozyten sowie des Anteils der statischen Leukozyten an der Zahl der intravaskulären Leukozyten fort. Weiterhin ist der Anteil der rollenden und statischen Leukozyten mit einem Median von 0,06 (0,00 - 0,45) in den K.O.-Tieren gegenüber einem medianen Wert von 0,02 (0,00 - 0,57) in der Kontrollgruppe und der Anteil der statischen Leukozyten mit einem Median von 0,00 (0,00 - 0,13) in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe gegenüber 0,00 (0,00 - 0,24) im Wildtyp in beiden Kohorten an Tag 10 ähnlich niedrig.

Leukozyten-Endothelinteraktion im Implantatlager

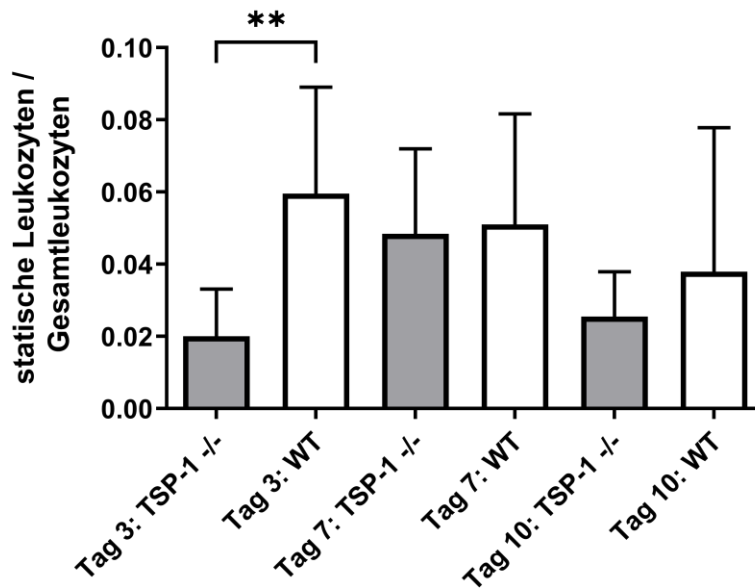


Abbildung 33: Säulendiagramme des Anteils der statischen an den Gesamtleukozyten im Implantatlager.

Mittelwert mit 95%-Konfidenzintervall des Anteils der statischen Leukozyten an der Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten an den Beobachtungstagen 3,7 und 10 in der DSC. TSP-1 -/- (N=8) und WT (N=8). P-Wert = 0,0005.

Leukozyten-Endothelinteraktion im Implantatlager

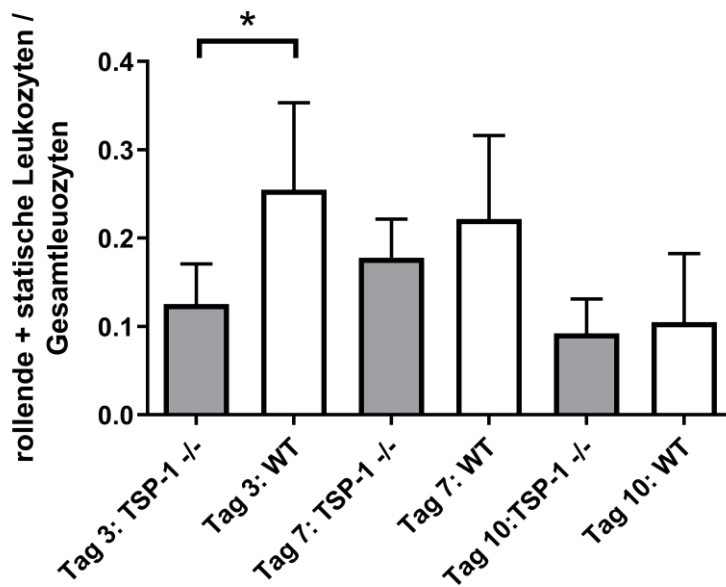


Abbildung 34: Säulendiagramme des Anteils der rollenden und statischen Leukozyten an den Gesamtleukozyten im Implantatlager.

Mittelwert mit 95%-Konfidenzintervall des Anteils der statischen Leukozyten an der Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten an den Beobachtungstagen 3,7 und 10 in der DSC. TSP-1 -/- (N=8) und WT (N=8). P-Wert = 0,0105.

Intravaskuläre Leukozyten im Implantatlager

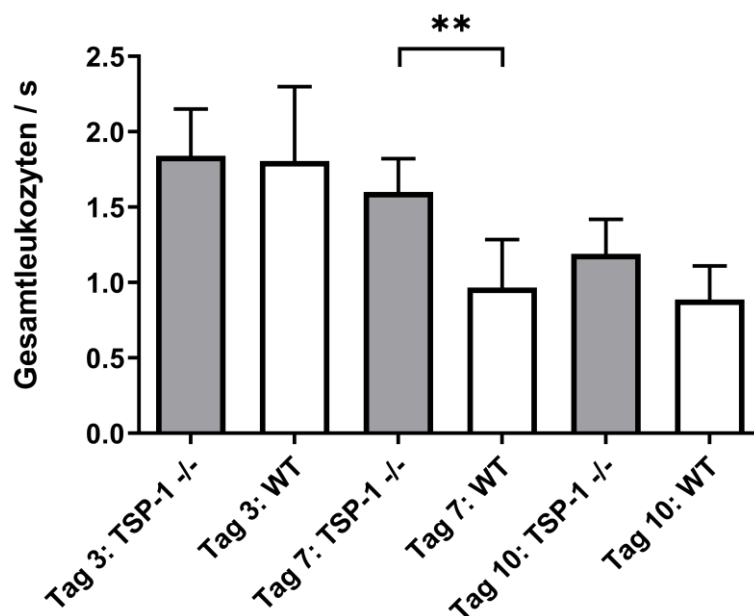


Abbildung 35: Säulendiagramme der intravaskulären Leukozyten im Implantatlager.

Mittelwert mit 95%-Konfidenzintervall der Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten, die sich aus den statischen Leukozyten, den rollenden Leukozyten und den Leukozyten im Blutstrom zusammensetzt, an den Beobachtungstagen 3,7 und 10 in der DSC. TSP-1 -/- (N=8) und WT (N=8). P-Wert = 0,0038.

6.1.3 Dynamische Desintegrationskraft

Die Ergebnisse der Messung der dynamischen Desintegrationskraft wurden in der aufgetragenen Kraft pro Fläche vermerkt. Hierbei ergab sich für die TSP-1 K.O. Gruppe als Mittelwert $0,290\text{cN/mm}^2$ bei einer Standardabweichung von $0,035\text{cN/mm}^2$. Der Zeitraum vom Beginn der Kraftübertragung bis zur Luxation des Implantats betrug in der TSP-1 K.O. Gruppe im Mittel 57s bei einer Standardabweichung von 20s.

6.1.4 Thrombozyten-Endothelinteraktion

Die Applikation mittels CFDA-SE angefärbter Thrombozyten am Beobachtungstag 14 erfolgte über die Punktion der Vena caudalis mediana. Die Darstellung aggregierter Thrombozyten 10min nach Transfusion mittels Fluoreszenzmikroskopie erwies sich ebenfalls als möglich und gelang in beiden Versuchsgruppen.

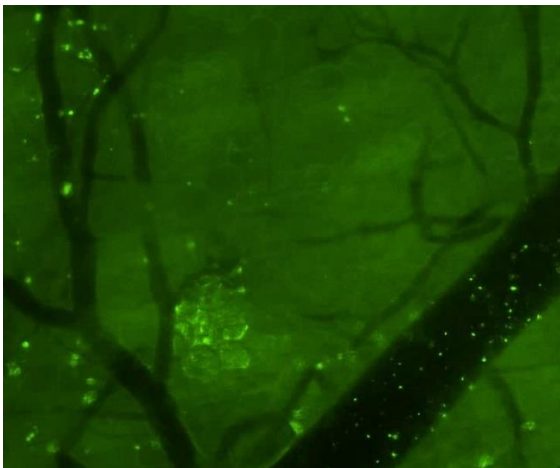


Abbildung 36: CFDA-SE markierte Thrombozyten im Implantatlager unmittelbar nach Applikation. Die Thrombozyten wurden einem TSP-1-defizienten Spendertier entnommen und in ein isogenes Tier transfundiert.

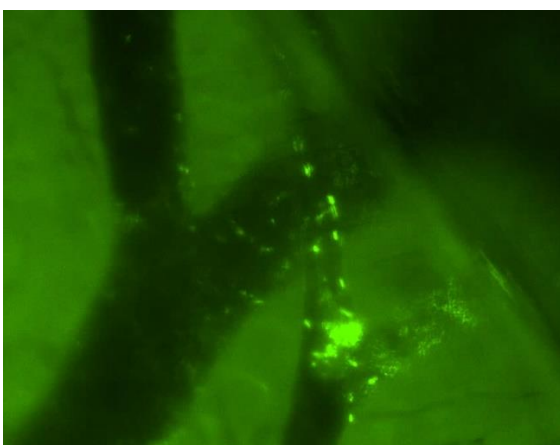


Abbildung 37: Aggregation CFDA-SE markierter Thrombozyten 10min nach Applikation. Die Thrombozyten wurden einer TSP-1-defizienten Maus entnommen und in ein isogenes Tier appliziert.

6.1.5 Histologische Fixierung

Die Auswertung der histologisch fixierten Implantate ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ausstehend.

6.2 Versuch 2: *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*

6.2.1 Funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager

Die fvd im Implantatlager wurde an den Beobachtungstagen 7 und 10 untersucht. An beiden Beobachtungstagen zeigen sich die Datensätze im Kolmogorow-Smirnow-Test normalverteilt.

An Beobachtungstag 7 weist die fvd in der TSP-1-Gruppe einen Mittelwert von $10,06\text{mm}^{-1}$ auf ($5,66 - 17,85\text{mm}^{-1}$). An Beobachtungstag 10 zeigt sich ein Anstieg der fvd-Werte in der TSP-1-Gruppe, der Mittelwert ist $13,43\text{mm}^{-1}$ ($10,50 - 18,36\text{mm}^{-1}$). Die Standardabweichung ist an Beobachtungstag 10 mit $2,26\text{mm}^{-1}$ gegenüber einem Wert von $3,33\text{mm}^{-1}$ an Beobachtungstag 7 zudem geringer.

In der VEGF-A-Gruppe beträgt die fvd an Beobachtungstag 7 im Mittel $12,74\text{mm}^{-1}$ ($7,61 - 19,68\text{mm}^{-1}$). An Beobachtungstag 10 ergibt sich in der VEGF-A-Gruppe ein Mittelwert der fvd von $18,27\text{mm}^{-1}$ ($9,33 - 28,68\text{mm}^{-1}$).

In den Kontrollgruppen ist auffällig, dass an Beobachtungstag 7 in der unbehandelten Kontrollgruppe die Standardabweichung mit $1,22\text{mm}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen drei Gruppen gering ausfällt bei einem Mittelwert der fvd von $10,89\text{mm}^{-1}$ ($9,74 - 13,64\text{mm}^{-1}$). Demgegenüber zeigt sich in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe ein Mittelwert von $12,21\text{mm}^{-1}$ ($8,18 - 17,48\text{mm}^{-1}$). An Beobachtungstag 10 beträgt die fvd in der unbehandelten Kontrollgruppe im Mittel $13,92\text{mm}^{-1}$ ($11,85 - 17,51\text{mm}^{-1}$). In der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe beträgt der Mittelwert der fvd an Beobachtungstag 10 $15,38\text{mm}^{-1}$ ($10,53 - 24,03\text{mm}^{-1}$).

In der Gesamtschau zeigen sich an Beobachtungstag 7 keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der fvd zwischen den Versuchsgruppen. Die Streubreiten der TSP-1, VEGF-A und NaCl-Versuchsgruppen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößert.

Demgegenüber ist am Beobachtungstag 10 die fvd in der VEGF-A-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (one-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD, P-Wert = 0.02029; Mann-Whitney-U-Test, P-Wert = 0,0431). Zudem ist die fvd in der VEGF-A-Gruppe signifikant höher als in der TSP-1-Gruppe (one-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD, P-Wert = 0.04375; Unpaired T-Test, P-Wert = 0,0024). Die Streubreite der Werte in der VEGF-A-Gruppe ist stark und die in der NaCl-Gruppe moderat gegenüber der TSP-1 Gruppe und der Kontrollgruppe vergrößert.

Tag 7: fvd im Implantatlager

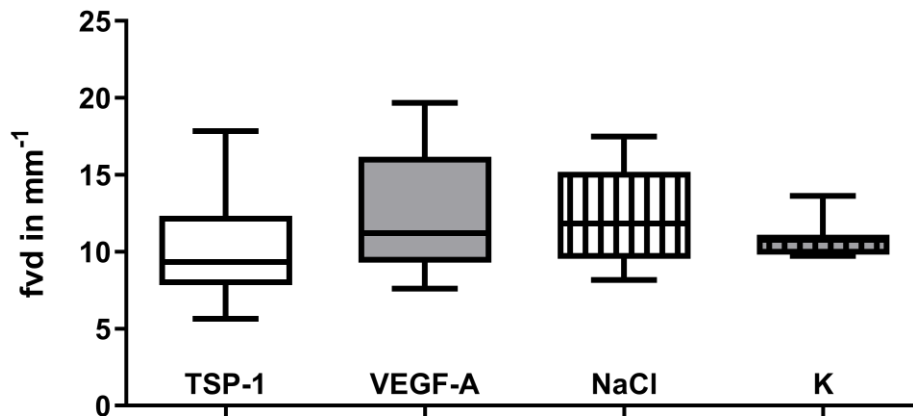


Abbildung 38: CAM Assay: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager an Versuchstag 7.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7).

Tag 10: fvd im Implantatlager

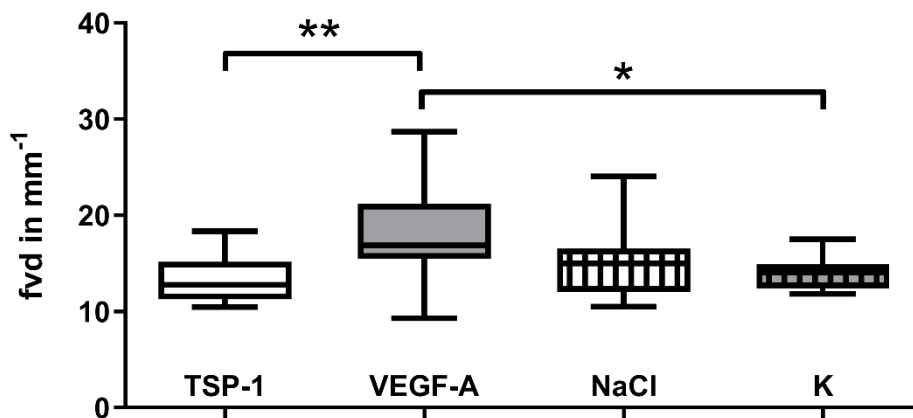


Abbildung 39: CAM Assay: Boxplots der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlager an Versuchstag 10.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7). ** P-Wert = 0,0024. * P-Wert = 0,0431.

6.2.2 Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager

Die Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste pro ROI im Implantatlager wurde an den Beobachtungstagen 7 und 10 ermittelt.

An Beobachtungstag 7 zeigen sich die Werte der TSP-1-Versuchsgruppe hinsichtlich der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste pro ROI nicht normalverteilt im Kolmogorow-Smirnow-Test bei Normalverteilung der anderen Datensätze. An Beobachtungstag 10 hingegen zeigen sich alle Datensätze normalverteilt.

An Beobachtungstag 7 liegt der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI in der TSP-1-Versuchsgruppe bei 52,65 (11 - 153) und der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI ist 103,15 (28 - 271).

An Beobachtungstag 10 zeigt sich in der TSP-1-Gruppe ein Anstieg der Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste. Der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI in der TSP-1-Versuchsgruppe ist 77,05 (45 - 122). Der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI beträgt 148,30 (90 - 222).

Demgegenüber beträgt am Beobachtungstag 7 der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI in der VEGF-A-Versuchsgruppe 73,30 (31 - 176). Der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI liegt bei 138,70 (65 - 320).

An Beobachtungstag 10 zeigt sich in der VEGF-A-Gruppe ein deutlicher Anstieg der Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste. Der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI in der VEGF-A-Versuchsgruppe ist erhöht auf 139,80 (29 - 313). Der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI steigt auf 246,60 (58 - 528).

In den Kontrollgruppen zeigen sich ebenfalls zwischen Beobachtungstag 7 und Beobachtungstag 10 Anstiege der Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager, die quantitativ mit dem Anstieg in der TSP-1-Versuchsgruppe vergleichbar sind.

So beträgt an Beobachtungstag 7 in der unbehandelten Kontrollgruppe der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI 52,29 (39 - 68) bei einer im Gruppenvergleich geringen Standardabweichung von 8,48, während sich ein Mittelwert der Gefäßäste pro ROI von 106,71 (83 - 128) zeigt. An Beobachtungstag 10 zeigen sich beide Werte wie folgt verändert: der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI ist 76,29 (43 - 120) gegenüber einem Mittelwert der Gefäßäste pro ROI von 144,00 (93 - 210).

In der mit NaCl-modifizierten Kontrollgruppe zeigt sich an Beobachtungstag 7 der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI bei 67,38 (28 - 125), der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI ist 131,00 (57 - 218). An Beobachtungstag 10 beträgt der Mittelwert der Gefäßverzweigungen pro ROI in der NaCl-Gruppe 101,92 (37 - 234), der Mittelwert der Gefäßäste pro ROI steigt auf 187,62 (76 - 404).

Zusammengefasst zeigt sich an Beobachtungstag 7 weder hinsichtlich der Anzahl der Gefäßverzweigungen noch hinsichtlich der Anzahl der Gefäßäste im Implantatlager ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. In der VEGF-A-Gruppe, der NaCl- und der TSP-1-Gruppe zeigt sich eine große Streubreite der Einzelwerte an Beobachtungstag 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

An Beobachtungstag 10 weist die mit VEGF-A behandelte Versuchsgruppe eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Gefäßverzweigungen (one-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD, P-Wert = 0.0213576; Unpaired T-Test, P-Wert 0,0067) und der

Gefäßäste (one-way ANOVA, post-hoc Tukey HSD, P-Wert = 0.0304265; Unpaired T-Test, P-Wert 0,0099) gegenüber der mit TSP-1 behandelten Versuchsgruppe auf. Von der Kontrollgruppe und NaCl-Versuchsgruppe unterscheiden sich die in der VEGF-A Versuchsgruppe gemessenen Werte dahingegen nicht signifikant. Ebenso zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TSP-1 und NaCl-Gruppe sowie zwischen TSP-1 und Kontrollgruppe. An Beobachtungstag 10 weisen die VEGF-A-Versuchsgruppe und die mit NaCl-modifizierte Kontrollgruppe im Vergleich zur TSP-1-Versuchsgruppe und zur unbehandelten Kontrollgruppe eine größere Streubreite der Einzelwerte auf.

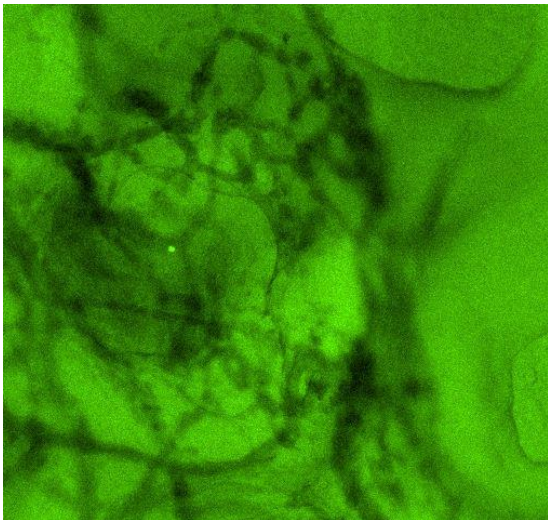


Abbildung 40: CAM Assay: Überlappung des Implantates durch Gefäße an Versuchstag 10.

Tag 7: Gefäßverzweigungen im Implantatlager

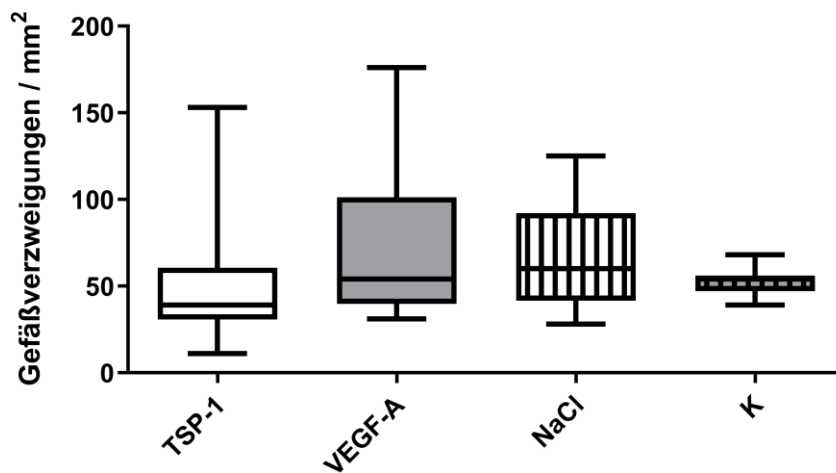


Abbildung 41: CAM Assay: Boxplots der Gefäßverzweigungen pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 7.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7).

Tag 10: Gefäßverzweigungen im Implantatlager

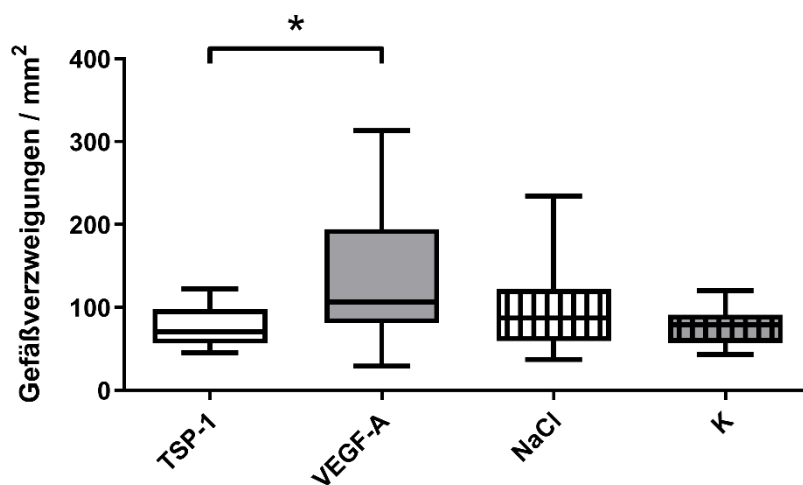


Abbildung 42: CAM Assay: Boxplots der Gefäßverzweigungen pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 10.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7). * P-Wert = 0,0067.

Tag 7: Gefäßäste im Implantatlager

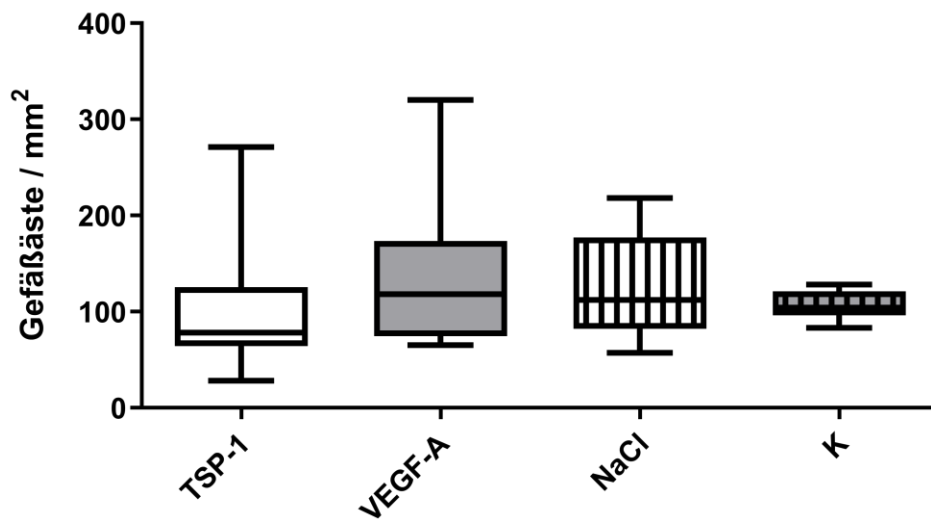


Abbildung 43: CAM Assay: Boxplots der Gefäßäste pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 7.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich zeigt den Median an. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7).

Tag 10: Gefäßäste im Implantatlager

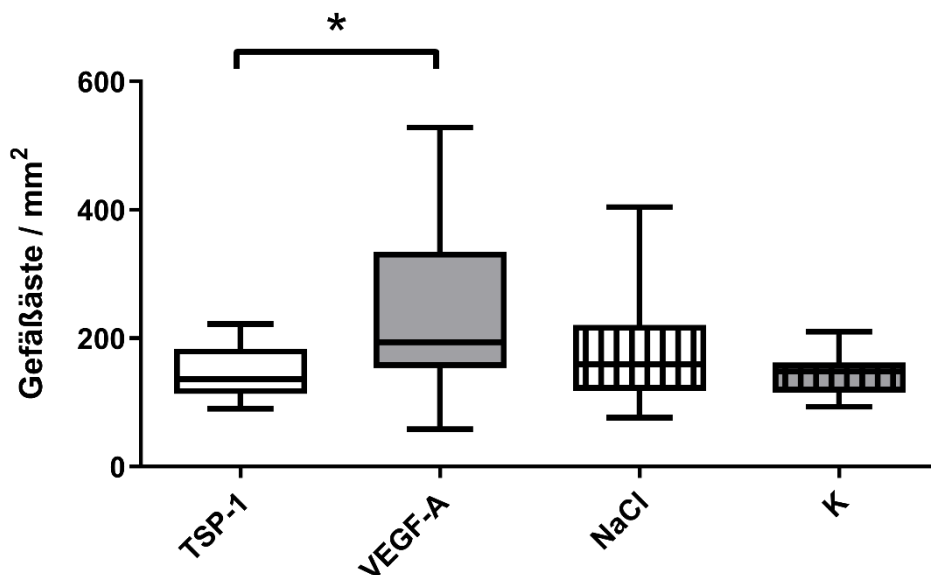


Abbildung 44: CAM Assay: Boxplots der Gefäßäste pro Fläche im Implantatlager an Versuchstag 10.

Die Whisker zeigen den minimalen und maximalen Wert an, der querlaufende Strich markiert den Median. TSP-1 (N=20), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7). * P-Wert = 0,0099.

6.2.3 Qualitative Implantatintegration

Die Auswertung der Integration der PPE-Implantate im CAM-Assay erfolgte qualitativ. Die über die Stitching Funktion von FIJI zusammengesetzten Übersichtsaufnahmen wurden hierfür verblindet. Die an den Beobachtungstagen 7 und 10 entstandenen Aufnahmen wurden dem oben genannten Bewertungssystem in fünf Kategorien eingeteilt, wobei Kategorie 1 den niedrigsten Integrationsgrad kennzeichnet und Kategorie 5 den höchsten.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Integrationsgrade zwischen den Versuchsgruppen im Kruskal-Wallis-Test.

Tabelle 1: CAM Assay / Integrationsgrade an Versuchstag 7

Versuchstag 7: Integrationsgrad	TSP-1 (n=19)	VEGF-A (n=10)	NaCl (n=13)	Kontrollgruppe (n=7)
I	4	4	3	1
II	3	1	4	3
III	5	2	4	1
IV	1	1	2	1
V	6	2	0	1

Tabelle 2: CAM Assay / Integrationsgrade an Versuchstag 10

Versuchstag 10: Integrationsgrad	TSP-1 (n=19)	VEGF-A (n=10)	NaCl (n=13)	Kontrollgruppe (n=7)
I	2	5	3	0
II	3	1	4	1
III	3	0	0	3
IV	2	0	4	1
V	9	4	2	2

Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 7

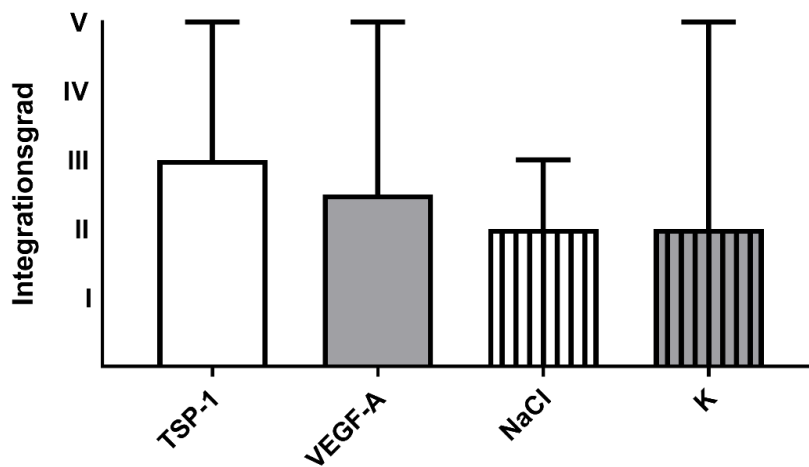


Abbildung 45: CAM Assay: Säulendiagramme der Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 7. Median mit 95%-Konfidenzintervall. TSP-1 (N=19), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7).

Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 10

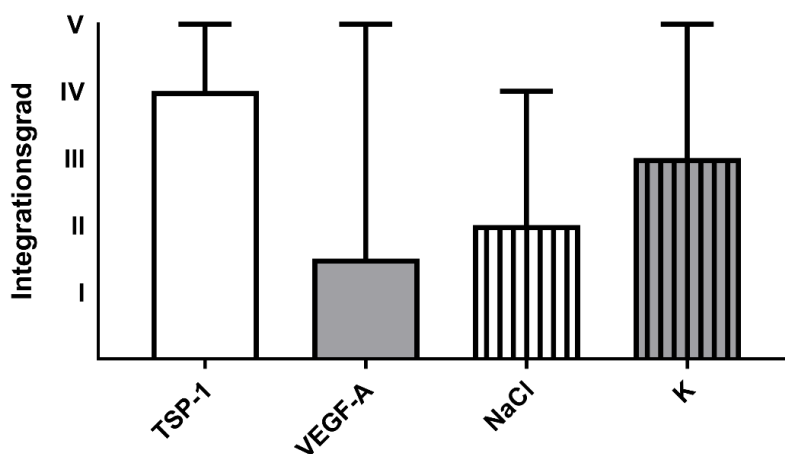


Abbildung 46: CAM Assay: Säulendiagramme der Integrationsgrade der PPE-Implantate an Beobachtungstag 10. Median mit 95%-Konfidenzintervall. TSP-1 (N=19), VEGF-A (N=10), NaCl (N=13) und K (N=7).

6.2.4 Versuchsgruppenanalyse

Die TSP-1-Versuchsgruppe umfasst 95 Versuchsobjekte, die VEGF-A-Versuchsgruppe umfasst 89 Versuchsobjekte, die NaCl-Gruppe umfasst 60 Versuchsobjekte und die Kontrollgruppe umfasst 58 Versuchsobjekte. Als Ausfallkriterien wurde unterschieden zwischen dem Absterben der CAM, der Luxation der Implantate und einer Fibrosierung am Beobachtungstag 10. Eine beobachtete Luxation des Implantates führte zum direkten Ausschluss des betroffenen Versuchsobjektes. Es wurden somit ausschließlich Versuchsobjekte ausgewertet, die am Auswertungstag 10 beanstandungslos waren.

Zu einem Absterben der CAM kam es in der TSP-1-Versuchsgruppe in 24%, in der VEGF-A-Versuchsgruppe in 34%, in der NaCl-Versuchsgruppe in 27% und in der Kontrollgruppe in 43%.

Eine spontane Luxation der Implantate trat in allen Versuchsgruppen etwa gleich häufig auf, so luxierten in der TSP-1-Gruppe 42% der Implantate, in der VEGF-A-Gruppe 44%, in der NaCl-Gruppe 42% und in der Kontrollgruppe 41%.

Zu einer Fibrosierung kam es in der TSP-1-Versuchsgruppe in 13%, in der VEGF-A-Versuchsgruppe in 10%, in der NaCl-Versuchsgruppe in 10% und in der Kontrollgruppe in 4%.

Somit waren am letzten Beobachtungstag in der TSP-1-Versuchsgruppe von ursprünglich 89 Versuchsobjekten 20 (21%) auswertbar, in der VEGF-A-Versuchsgruppe von 83 Versuchsobjekten 10 (12%), in der NaCl-Gruppe von 60 Versuchsobjekten 13 (21%) und in der Kontrollgruppe von 58 Versuchsobjekten 7 (12%).

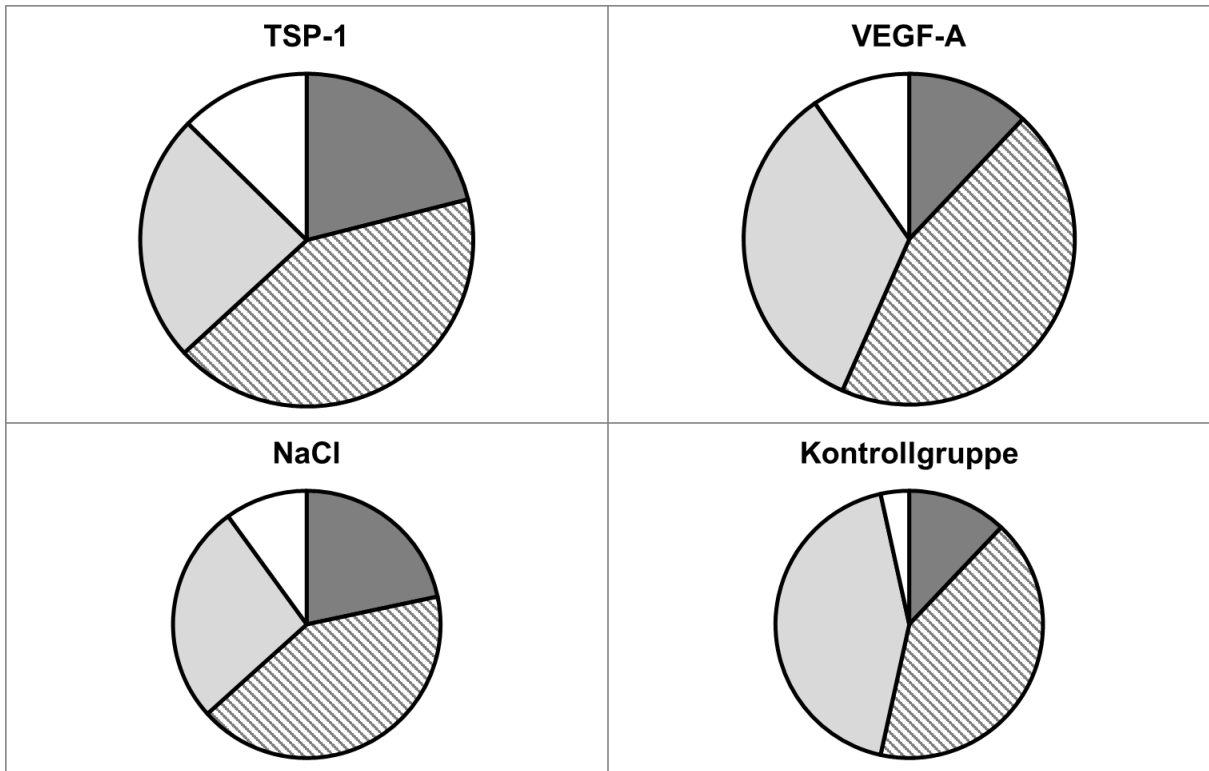


Abbildung 47: CAM Assay: Kreisdiagramme Versuchsgruppenanalyse.

Der Anteil der auswertbaren Versuchssubjekte ist dunkelgrau dargestellt, der Anteil der abgestorbenen Versuchssubjekte ist hellgrau dargestellt und der Anteil der aufgrund einer Fibrosierung der CAM nicht auswertbaren Versuchssubjekte ist weiß dargestellt. Mittels grauer Schraffur ist der Anteil der Versuchssubjekte kenntlich gemacht, bei denen es zu einer Luxation der PPE-Implantate kam.

6.2.5 Histologische Fixierung

Nach Abschluss der Untersuchung und Dekapitation der Embryonen wurden die einliegenden Implantate und das Umgebende CAM-Gewebe präpariert und histologisch fixiert. Die Analyse der histologisch fixierten PPE-Implantate ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ausstehend.

7 Diskussion

7.1 Versuch 1: Modell der transparenten Rückenhautkammer

7.1.1 Gefäßparameter

Zur Analyse der Gefäßnetzwerke im Implantatlager wurden die fvd sowie die Anzahl der Gefäßäste und die Anzahl der Gefäßverzweigungen in den vorab definierten ROIs ermittelt.

In beiden Versuchsgruppen zeigt sich über die Beobachtungstage 3, 7 und 10 eine Zunahme sowohl der fvd als auch der Anzahl der Gefäßäste und Gefäßverzweigungen pro ROI im Implantatlager.

Während sich an Beobachtungstag 3 die Boxplots der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe ähneln, ist an den Beobachtungstagen 7 und 10 zu beobachten, dass in der Kontrollgruppe deutlich höhere Spannweiten auftreten. Gleichwohl zeigt sich im Gruppenvergleich kein signifikanter Unterschied zwischen den TSP-1-defizienten Mäusen und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Absolutwerte der Gefäßparameter.

In einer kleinen Versuchsgruppe sind im tierexperimentellen Setting gerade bei so individuellen und dynamischen Parametern wie der Gefäßnetzanalyse zwangsläufig hohe Streubreiten zu erwarten (Aban and George, 2015, Dell et al., 2002).

Der über die Beobachtungstage 3, 7 und 10 in beiden Versuchsgruppen beobachtete Anstieg der fvd, der Gefäßverzweigungen und der Gefäßäste pro Fläche im Implantatlager lässt sich durch eine Stimulation der Angiogenese durch eine gegen den Implantatkörper gerichtete Inflammationsreaktion vom Fremdkörpertyp erklären (Ehrmantraut et al., 2010).

Grundsätzlich muss in der Interpretation der Ergebnisse auch den Störfaktoren, denen die DSC, ebenso wie andere Angiogenese-Modelle, und der gewählte Versuchsaufbau ausgesetzt sind, Rechnung getragen werden. Einen systematischen und beide Versuchsgruppen betreffenden Störfaktor stellen phototoxische durch die Fluoreszenzmikroskopie hervorgerufene Effekte dar. Um diese zu minimieren, wurde auf die genaue Einhaltung der vorgegebenen Expositionszeiten geachtet (Icha et al., 2017). Aufgrund der exponierten, rumpffernen Lage des in der Rückenhautkammer einsehbaren Gewebes liegt die Temperatur im Untersuchungsfeld unterhalb der Körpertemperatur der Mäuse (Moy et al., 2011). Dieser methodenimmanente Störfaktor, dem beide Versuchsgruppen ausgesetzt sind, beeinträchtigt die Durchblutungsparameter im Beobachtungsfeld und lässt sich durch eine Erhöhung der Raumtemperatur minimieren (Endrich et al., 1979). Die mit einer permanenten Erhöhung der Raumtemperatur einhergehende Beeinträchtigung des Tierwohls wurde als schwerwiegender betrachtet, sodass im Versuchsprotokoll eine artgerechte Haltung bei einer Raumtemperatur von 21 Grad Celsius festgelegt wurde.

Der sowohl im Wildtyp als auch in den TSP-1-defizienten Mäusen beobachtete Anstieg der vaskulären Parameter im Implantatlager spielt eine zentrale Rolle für die vaskuläre Integration des Implantats. In hinsichtlich des Versuchsaufbaus vergleichbaren Experimenten, in welchen die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten aber auch von Implantaten aus PLGA in der DSC untersucht wurde, zeigte sich, dass die vaskuläre Integration der Implantate von den Randzonen des Implantates aus

angestossen wird (Hessenauer et al., 2018, Laschke et al., 2014, Reichel et al., 2015, Später et al., 2021, Strieth et al., 2010, Rucker et al., 2006).

Auch wenn die Absolutwerte der Gefäßparameter im Implantatlager keinen starken Einfluss der TSP-1-Defizienz auf die vaskuläre Integration der PPE-Implantate suggerieren, zeigt sich im Wildtyp an den Beobachtungstagen 10,12 und 14 eine im Vergleich zur TSP-1-defizienten Versuchsgruppe im Mittelwert erhöhte fvd im Implantat. Zudem zeigt sich der Anstieg der fvd im Implantat von Beobachtungstag 10 auf Beobachtungstag 14 im Wildtyp signifikant erhöht. Zudem sind die Anzahl an Gefäßästen pro Implantat und die Anzahl an Gefäßverzweigungen pro Implantat im Wildtyp an Beobachtungstag 14 auf dem festgelegten Signifikanzniveau größer als in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe.

Gerade im Rahmen einer explorativen Fragestellung kann angesichts der Beobachtungen ein fördernder Einfluss des endogenen TSP-1 auf die Vaskularisation von PPE-Implantaten angenommen werden.

Diese Schlussfolgerung kontrastiert die in der Literatur vielfach vertretene Position, TSP-1 als potenten endogenen Inhibitor der Angiogenese aufzufassen (Iruela-Arispe et al., 1999, Lawler and Lawler, 2012, Nor et al., 1997).

7.1.2 Leukozyten-Endothelinteraktion

Die Analyse der Leukozyten-Endothelinteraktion zeigt in der Kontrollgruppe an Beobachtungstag 3 eine signifikant gesteigerte Anzahl rollender und statischer Leukozyten. An den Folgetagen sind hinsichtlich der Leukozytenaktivierung keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

In der Literaturdiskussion ist unter dem Kapitel „Biomaterialintegration“ die Reaktion des Körpers auf eingebrachtes Fremdmaterial ausführlich dargelegt. Unmittelbar mit der Implantateinbringung und dem damit verbundenen Gewebeschaden finden sich neutrophile Granulozyten und andere Zellen des angeborenen Immunsystems im Implantatlager ein. Die akute Immunreaktion auf eingebrachte Fremdkörper wird somit vor allem vom angeborenen Immunsystem getragen und durch den Gewebeschaden sowie die Gegenwart des Fremdmaterials ausgelöst (Boehler et al., 2011). Als matrizelluläres Protein stimuliert TSP-1 insbesondere über CD47 vermittelt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Dadurch fördert TSP-1 die Bindung von Monozyten an Endothelzellen (Narizhneva et al., 2005). Über diesen Mechanismus verstärkt TSP-1 *in vivo* die durch das angeborene Immunsystem vermittelte Entzündungsreaktion, die Aktivierung inflammatorischer Makrophagen und die Rekrutierung polymorphkerniger Leukozyten (Martin-Manso et al., 2012).

Zudem aktiviert TSP-1 Makrophagen in Abhängigkeit von TLR4 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Ferner induziert TSP-1 die Bildung von TNF- α über TLR4 (Li et al., 2013). Über diese Mechanismen könnte sich die signifikant reduzierte Leukozytenaktivierung in TSP-1 defizienten Mäusen gerade in der frühen Phase nach Implantatintegration erklären.

Durch Selektine vermittelt entstehen zwischen den Endothelzellen und Leukozyten lose Bindungen, die bewirken, dass sich die Leukozyten langsam – was als rollen beschrieben wird - entlang des Endothels bewegen. Durch Chemokine auf der luminalen Seite des Endothels kommt es nun zur Aktivierung der Leukozyten, woraufhin es durch leukozytäre Integrine vermittelt zum Anhalten der Leukozyten kommt. Diese statischen Leukozyten migrieren nun entweder transzellulär oder parazellulär durch das Endothel (Langer and Chavakis, 2009, Petri et al., 2008).

Die Oberflächenbeschaffenheit des eingebrachten Biomaterials hat großen Einfluss auf das Ausmaß der Immunreaktion (Zhou and Groth, 2018). Durch die Anlagerung von Fibrinogen und Komplementfragmenten aus dem Blutplasma an die Oberfläche von Biomaterialien kommt es über Integrin-Rezeptoren vermittelt zur Adhäsion von Leukozyten. Adhärente Monozyten schütten dann Cytokine und Wachstumsfaktoren aus, die die Anlagerung und die Aktivität von anderen Zelltypen regulieren, was letztlich die Grundlage für die fibrovaskuläre Integration der eingebrachten Biomaterialien darstellt, aber bei einer dysregulierten Aktivierung auch die Grundlage einer Abstoßung bedingen kann (Keselowsky et al., 2007).

Der Anteil rollender und statischer Leukozyten an den Gesamtleukozyten bewegt sich in der Kontrollgruppe am Beobachtungstag 7 auf ähnlichem Niveau wie an Beobachtungstag 3. In der TSP-1-defizienten Gruppe gleicht sich der Anteil der rollenden und statischen Leukozyten an Beobachtungstag 7 der Kontrollgruppe an. An Beobachtungstag 10 sinkt der Anteil der rollenden und statischen Leukozyten an den Gesamtleukozyten in beiden Versuchsgruppen deutlich ab. Dies lässt sich als Abschwächung der Entzündungsreaktion in beiden Versuchsgruppen interpretieren. Dass im Wildtyp im Vergleich zu TSP-1-defizienten Mäusen die frühe Entzündungsreaktion gesteigert ist, sich dann aber im Verlauf der Entzündungsreaktion keine weiteren signifikanten Unterschiede mehr detektieren lassen, lässt sich mit der in der Literatur berichteten Verknüpfung der Expressionsrate von TSP-1 mit Gewebeschaden in Korrelation setzen. So weist unbeschädigte Haut nahezu kein TSP-1 auf. Die Expression von TSP-1 wird akut durch Gewebeschaden induziert und fällt mit der abklingenden Entzündungsreaktion ab (Kyriakides and MacLauchlan, 2009). Die Arbeitsgruppe um DiPietro berichtet, dass TSP-1 messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) bereits 10 Tage nach Setzung einer dermalen Wunde im Wundgebiet in Mäusen nicht mehr detektierbar ist und dass ein wesentlicher Anteil des im Wundbett nachgewiesenen TSP-1 von Makrophagen produziert wird. Die Arbeitsgruppe zeigt ferner, dass die lokale Einbringung von TSP-1 Antisense-RNA – wodurch eine Beeinträchtigung der TSP-1 Synthese erreicht wird – ein Störung der Wundheilung hervorruft (DiPietro et al., 1996).

An Versuchstag 7 zeigt sich die Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten in den TSP-1-defizienten Versuchstieren gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht. Wie oben ausgeführt, zeigen sich mit Ausnahme von Versuchstag 3 jedoch keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der statischen und rollenden Leukozyten. Somit zeigt sich bei erhöhter Gesamtleukozytenzahl kein Hinweis auf eine an Versuchstag 7 in den TSP-1-defizienten Tieren verstärkte Leukozytenaktivierung. Die Beobachtung der erhöhten Leukozytenzahl steht in Einklang mit der Literatur hinsichtlich des Phänotyps von TSP-1 K.O.-Mäusen. So berichten Lawler et al., dass TSP-1-defiziente Mäuse signifikant erhöhte Leukozytenzahlen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Lawler et al., 1998). Diese Erhöhung der Zellzahl betrifft alle Leukozyten-Subpopulationen, wobei die Anzahl der Monozyten und eosinophilen Granulozyten am stärksten erhöht ist (Lawler et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen nun auch die Relevanz, die endogenes TSP-1 in der Initiierung der Immunreaktion bei der Einbringung eines alloplastischen Fremdmaterials einnimmt.

7.1.3 Explorative Thrombozytentransfusion und Evaluation der Thrombozyten-Endothelinteraktion

Sowohl das Verfahren der Katheterisierung der Vena jugularis als auch die Punktion der Vena caudalis mediana stellen suffiziente Verfahren zur Thrombozytentransfusion dar.

Die Katheterisierung der Vena jugularis bietet den Vorteil der genauen Kontrollierbarkeit des applizierten Volumens und der exakten Regulationsmöglichkeit der Applikationsgeschwindigkeit. Zudem bietet sich der liegende Katheter auch zur Applikation anderer Substanzen wie beispielsweise von Fluorophoren an. Nachteilig ist die Erforderlichkeit der Narkoseführung, da diese die Thrombozytenaktivität (Laux and Seiffge, 1993) und die hämodynamischen Parameter beeinflusst (Menger et al., 2002). Zudem ist die Einbringung des Katheters operationstechnisch anspruchsvoll und die Verwendung im Kontext von Versuchsprotokollen, die Applikationen an mehreren Tagen vorsehen, erscheint unter hygienischen, das Tierwohl betreffenden und praktischen Gesichtspunkten nicht erstrebenswert.

Die Vena caudalis mediana stellt einen Standardzugangsweg zur intravenösen Applikation dar, ist aber hinsichtlich der Quantifizierung der applizierten Menge fehleranfällig (Groman and Reinhardt, 2004) und stellt daher ebenfalls Anforderungen an die praktischen Fertigkeiten des Experimentators (Schoch et al., 2014). Dafür Bedarf diese Applikationsform weder der Narkoseführung noch der lokalen Anästhesie. Zudem lässt sich über den Einsatz von Hilfsmitteln wie Restrainer und Wärmelampe die Punktierbarkeit der Vene verbessern (Tsai et al., 2015). Im Rahmen dieser Experimentation erfolgte die Thrombozytentransfusion ausschließlich über die Vena caudalis mediana.

Die CFDA-SE markierten Thrombozyten ließen sich 10min nach Applikation in den TSP-1 K.O.-Mäusen sowie in der Kontrollgruppe intravitalmikroskopisch darstellen. Zudem gelang in beiden Versuchsgruppen der Nachweis von Thrombozytenaggregaten, allerdings ohne dass eine quantitative Analyse zielführend erschien.

7.1.4 Dynamische Desintegrationskraft

Die dynamische Desintegrationskraft dient als Parameter der Beurteilung der biomechanischen Integration von Implantaten, dem autorenübergreifend eine hohe Aussagekraft zugemessen wird. Gleichwohl wird über eine hohe Fehleranfälligkeit und eine große Varianz der erhobenen Werte berichtet (Hessenauer et al., 2018, Hussain et al., 2016, Reichel et al., 2015, Strieth, 2013).

Die im Versuch im Wildtyp gemessenen Werte unterscheiden sich nicht signifikant von denen, die in den TSP-1-defizienten Mäusen (n=3) ermittelt wurden. Allerdings hat diese Beobachtung aufgrund der geringen Zahl an unbeanstandeten Messvorgängen eine geringe Gültigkeit.

So konnten in der Experimentation mehrere Fehlerquellen identifiziert werden. Beispielsweise kam es zur akzidentellen Subluxation des PPI-Implantats durch ungewollte Kraftausübung bei der Fadenanbringung, was zu falsch-niedrigen Messergebnissen führte. Durch eine fehlerhafte Fadenanbringung, die eine Beteiligung des Hautgewebes hervorrief, kam es zur Messung falsch-hoher Werte. Ferner erwies sich die Absenkung des mechanischen Hubtisches als nur

eingeschränkt geeignet, eine glatte Steigerungskurve der Zugkraft über die Zeit zu reproduzieren zu erzeugen.

Um die interne Validität des Verfahrens zu verbessern, könnte die Vorlage einer Schlaufe im Implantat vor dessen Einbringung in das Beobachtungsfeld sowie die Verwendung eines hydraulischen Hubtisches hilfreich sein. Gleichwohl würde mit einer vorgelegten Schlaufe ein zweites Fremdmaterial und damit ein zusätzlicher Störfaktor in die Rückenhautkammer eingebracht.

7.2 Versuch 2: *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*

7.2.1 Gefäßparameter

Die zur Beurteilung der vaskulären Netzwerke herangezogenen Parameter der fvd, der Anzahl der Gefäßverzweigungen sowie der Anzahl der Gefäßäste im Implantatlager sind etablierte Parameter zur Angiogenese-Quantifizierung im CAM Assay (Miller et al., 2004, Nowak-Sliwinska et al., 2014). Die als Positivkontrolle vorgesehene Behandlung mit VEGF-A, das im CAM Assay in unterschiedlichen Versuchsprotokollen vaskuläre Parameter positiv beeinflusst (Rumney et al., 2019, Singh et al., 2012), unterstreicht durch die signifikante Erhöhung der fvd gegenüber der Kontrollgruppe an Beobachtungstag 10 die Tauglichkeit des Versuchsaufbaus. Zudem zeigen die vergleichbaren Ergebnisse der NaCl-behandelten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, dass der als Störfaktor anzusehende Applikationsprozess, wenn überhaupt nur geringe Auswirkung auf die Bildung vaskulärer Netzwerke in Implantatnähe hat.

Mechanischen Kräfte, die in geringem Maße durch den Implantatkörper auf die CAM wirken, fördern sowohl Intussuszeption als auch Vessel Sprouting in der CAM (Belle et al., 2014). Da die Implantatkörper in den Versuchsgruppen einheitlich sind, tritt dieser mechanisch induzierte Effekt in gleichem Maß in den einzelnen Gruppen auf.

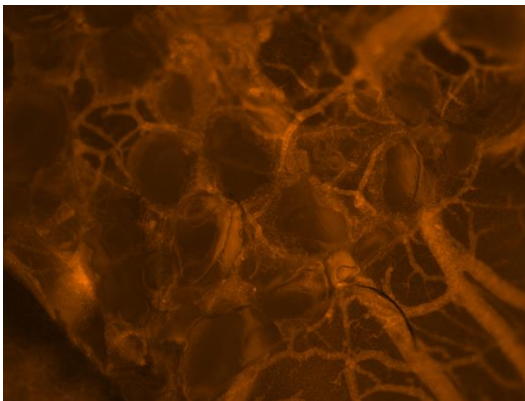


Abbildung 48: CAM Assay: Einzelaufnahme des Implantatrandes nach TRITC-Dextran-Applikation an Versuchstag 10.

Die Aufnahme wurde nach intravenöser Applikation von TRITC-Dextran im CAM Assay. Das abgebildete Implantat wurde mit VEGF-A modifiziert. Die abgebildeten Gefäße sind speichenartig zum Implantat ausgerichtet, was auf eine proangiogene Stimulation hinweist.

Bei der Interpretation der im CAM Assay beobachteten Veränderung der Angiogenese-Parameter muss diskutiert werden, ob die von einigen Autoren beschriebenen und als Hinweis auf einen proangiogenen Stimulus interpretierte speichenartige Ausrichtung der vaskulären Netzwerke nicht im Wesentlichen durch das Implantat bedingt sein könnten und nur geringgradig durch die Art der Oberflächenmodifizierung. So beschreiben Jakob et al. bereits 1978, dass die CAM auf unterschiedliche organische und anorganische Materialien mit der Proliferation ektodermaler Zellen und Fibroblasten sowie der Ausbildung von typischerweise speichenartig zum Fremdmaterial hin orientierter vaskulärer Netze reagiere (Jakob et al., 1978). Diese

speichenartige Anordnung der Blutgefäße sowie eine Steigerung der fvd, der Anzahl der Gefäßverzweigungen sowie der Gefäßäste wurde im Versuch in allen Gruppen beobachtet. Dennoch waren trotz gleicher PPE-Implantate hinsichtlich funktioneller Gefäßdichte und der Anzahl an Gefäßverzweigungen und Gefäßästen pro Beobachtungsfeld signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen messbar. Diese messbaren Unterschiede erlauben den Rückschluss auf das proangiogene respektive antiangiogene Potenzial der Oberflächenmodifizierungen.

Die Beobachtungen, dass die Applikation von TSP-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen messbaren Einfluss auf die vaskulären Netzwerke im Implantatlager hat und dass die Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßäste pro Fläche in der VEGF-A behandelten Versuchsgruppe sogar signifikant gegenüber der mit TSP-1 behandelten Gruppe erhöht sind, lassen unterschiedliche Rückschlüsse zu.

Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass das applizierte TSP-1 im CAM Assay endogene Wachstumsfaktoren zu einem gewissen Maße antagonisieren könnte und somit deren Aktivitätsentfaltung in Implantatnähe behindert. VEGF nimmt eine zentrale Bedeutung in der embryonalen Vaskulo- und Angiogenese ein (Harry and Paleolog, 2003, Flamme et al., 1995). Es ist gesichert, dass im CAM Assay hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors intrinsisch vorliegen (Casanova et al., 2020). Iruela-Arispe et al. untersuchten im CAM Assay den Einfluss von TSP-1 und von TSP-1 Subdomänen auf die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Angiogenese. Das vertikale Gefäßwachstum in ein mit VEGF und / oder FGF-2 angereichertes und auf die CAM aufgebrachtes Kollagen-Gel Pellet, wurde durch TSP-1 um 35% reduziert. Wurde der Versuch ohne Wachstumsfaktoranreicherung durchgeführt, konnte keine signifikante Reaktion durch TSP-1 hervorgerufen werden (Iruela-Arispe et al., 1999). Im Tube formation assay (TFA), einer *in vitro*-Methode zur Beurteilung angiogener Prozesse auf Zellebene, reagieren Human mammary epithelial cells (HMEC) zeigt sich das proangiogene Potenzial von VEGF durch die Ausbildung von Zellverbindungen zwischen den einzelnen HMECs. Durch die Kombination von VEGF mit TSP-1 wird dieser Effekt aufgehoben. Durch die alleinige Applikation von TSP-1 zeigt sich sogar ein antiangiogener Effekt im TFA mit HMECs (Koch, 2012).

Dass TSP-1 auf verschiedenen Wegen mit VEGF und FGF-2 interagiert und diese partiell auch antagonisiert, gilt als gesichert (Rusnati et al., 2010). Ferner könnte die endogen im Rahmen der Embryonalentwicklung gesteigerte Konzentration proangiogener Wachstumsfaktoren die Wirkung von TSP-1 auf das Gefäßnetz der CAM gewissermaßen überdecken.

Ein weiterer Erklärungsansatz greift die Höhe der eingesetzten Dosierung auf. Demnach könnte die TSP-1 Dosis zu niedrig gewählt sein, um einen messbaren Effekt auf die Angiogenese im CAM Assay zu entfalten. Diesbezüglich ist anzumerken, dass sich die gewählte Zieldosis von 550ng TSP-1 an der Literatur orientiert und bewusst äquimolar zur VEGF-A Dosis gewählt wurde, die im Versuch eine signifikante Steigerung der vaskulären Parameter bewirkt (BenEzra et al., 1993, Iruela-Arispe et al., 1999).

Diskutiert werden sollte zudem, ob sich Form, Zeitpunkt und Art der Applikation des TSP-1 nachteilig auf die Biomaterialintegration der PPE-Implantate ausgewirkt haben könnten. Die Plasma-Clearance von humanem TSP-1 folgt nach Switalska et al. einem biphasischen exponentiellem Verlauf, sodass die *half-life fast* mit 29,9min und die *half-life slow* mit 190min angegeben wird (Switalska et al., 1985). Dawes et al. berichten

dagegen von einer Halbwertszeit von 9h in vivo (Dawes et al., 1983). Gleichwohl ergeben sich für die unterschiedlichen Spaltprodukte des Makromoleküls nochmals abweichende Werte. So liegt beispielsweise die biologische Halbwertszeit des anti-angiogen-wirksamen Heptapeptid Fragments des second type-1 repeats von TSP-1 bei weniger als einer Minute (Haviv et al., 2005).

Die Oberflächenmodifizierung mittels TSP-1 wurde unmittelbar nach der Implantation vorgenommen und es wurde auf wiederholte Applikationen verzichtet, um der klinischen Praxis der Einbringung von alloplastischen Grafts (Buhr et al., 2020, Eckrich et al., 2020) Rechnung zu tragen, in der wiederholte Applikationen in das Wundbett und Implantatlager postoperativ nicht praktikabel erscheinen. Zudem ist die biologische Halbwertszeit von VEGF-A, das im Versuch an Tag 10 die fvd im Implantatlager signifikant steigerte, kürzer als die des TSP-1. Nach intravenöser Applikation liegt sie bei 13min und nach intraperitonealer Applikation bei 3,6h (Rennel et al., 2008). Letztlich muss bedacht werden, dass sowohl TSP-1 als auch VEGF-A im Versuch weder intravenös noch intraperitoneal oder subkutan appliziert wurden. Somit lässt sich die Konzentration der Wachstumsfaktoren über die Zeit im Implantatkörper und Implantatlager im CAM Assay nur bedingt über die oben genannten Halbwertszeiten abschätzen.

Die in den TSP-1-K.O.-Mäusen in der DSC beobachtete und gegenüber der Kontrollgruppe eingeschränkte Vaskularisation der Implantatkörper ist aufgrund der umfassenden modulatorischen Eigenschaften von TSP-1 wahrscheinlich multifaktoriell bedingt. Allerdings legt die beobachtete Einschränkung der initialen Phase der Entzündungsreaktion in der TSP-1-defizienten Versuchsgruppe eine immunvermittelte Genese der Unterschiede des Vaskularisationsmusters nahe.

Das im CAM Assay eingesetzte Hühnerei verfügt über ein unvollständig ausgereiftes Immunsystem. Erst nach Entwicklungstag 18 kann der Hühnerembryo als immunkompetent angesehen werden. T-Zellen treten frühestens ab dem 11. Entwicklungstag auf, B-Zellen frühestens ab dem 12. Entwicklungstag und funktionsfähige Makrophagen, die wie oben ausgeführt von besonderer Bedeutung in der initialen Immunreaktion gegenüber einem Fremdkörper sind, sind ab dem 14. Entwicklungstag nachweisbar (Mangir et al., 2019).

Über eine Immunreaktion vermittelte proangiogene Prozesse sind daher im CAM Assay aufgrund des entwicklungsbedingt unausgereiften Immunsystems nicht homolog zum Mausmodell interpretierbar. Im Umkehrschluss allerdings untermauert die gewonnene Erkenntnis einer ausbleibenden proangiogenen Wirkung einer Oberflächenmodifizierung mit TSP-1 im CAM Assay die Vermutung, dass der Einfluss von endogenem TSP-1 auf die vaskuläre Integration vom Fremdmaterialien über das Immunsystem vermittelt wird.

7.2.2 Qualitative Implantatintegration

Die qualitative Auswertung der Implantatintegration ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

7.2.3 Versuchsgruppenanalyse

Eine spontane Luxation der PPE-Implantate trat unabhängig von der Behandlung in allen Gruppen in zwischen 41 und 44% der Versuchsobjekte auf und erscheint dementsprechend unbeeinflusst durch die Art der Behandlung und auch unabhängig davon, ob eine Behandlung der Implantate vorgenommen wurde. Interessanterweise

zeigen sich zwischen den Versuchsgruppen Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von Fibrosierung und der Häufigkeit des Absterbens der CAM. In der Kontrollgruppe treten die meisten Ausfälle aufgrund eines Absterbens der CAM (43%) und die wenigsten Ausfälle aufgrund einer Fibrosierung (4%) auf, während in der TSP-1-Gruppe im Vergleich die wenigsten Ausfälle durch ein Absterben der CAM auftraten (24%) und prozentual die intensivste Fibrosierung der CAM (13%). Setzt man diese Beobachtungen in Bezug zu den Ausfallzahlen der VEGF-A und NaCl-Versuchsgruppe, so fällt auf, dass in diesen Fibrosierung in der VEGF-A-Gruppe mit 10% und in der NaCl-Gruppe mit 10% auftrat und somit prozentual ähnliche Werte wie in der TSP-1-Gruppe (13%) liegen. Im Bezug auf die durch das Absterben der CAM-bedingten Ausfälle liegt der prozentuale Anteil der Ausfälle in der NaCl-Gruppe mit 27% ebenfalls in einem ähnlichen Bereich wie in der TSP-1-Gruppe (24%), während der Anteil der VEGF-A-Gruppe mit 34% zwischen TSP-1-Gruppe und NaCl-Gruppe einerseits und Kontrollgruppe (43%) andererseits liegt. Die Überlebensraten liegen damit über alle Versuchsgruppen in einem Bereich von 76 – 57%, was sich mit den in der Literatur angegebenen Überlebensraten deckt (Lokman et al., 2012). Festzuhalten ist, dass es durch eine Oberflächenmodifizierung der eingebrachten PPE-Implantate mit TSP-1 zu keiner signifikanten Verschlechterung hinsichtlich Ausfall- und Auswertbarkeit gekommen ist, was für eine gute Verträglichkeit des matrizellulären Proteins spricht.

Um sicherzustellen, dass alle Versuchsgruppen vergleichbaren systemischen Einflüssen wie etwa wechselnden Außentemperaturen – welcher die Versuchsobjekte beispielsweise im Rahmen der Überführung aus dem Bebrüter zum Mikroskop ausgesetzt sind – ausgesetzt sind, liefen die Versuchsdurchläufe parallel.

7.3 Ausblick

An TSP-1 defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von endogenem TSP-1 die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten beeinträchtigt abläuft. Diese Beeinträchtigung zeigt sich an einer signifikant abgeschwächten frühen Entzündungsreaktion und einer signifikant eingeschränkten Ausbildung vaskulärer Netzwerke im Implantat. Im CAM Assay zeigten sich zwar eine gute Verträglichkeit einer Oberflächenmodifikation mit TSP-1, aber es konnte kein Einfluss auf die Vaskularisation des Implantatlayers nachgewiesen werden, während sich durch eine Oberflächenmodifizierung mit VEGF-A ein signifikant positiver Effekt in Form einer Steigerung der funktionellen Gefäßdichte im Implantatlayer zeigt.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt die reduzierte mikrovaskuläre Integration der Implantate in TSP-1-defizienten Mäusen, dass in Anwesenheit eines funktionierenden Immunsystems, TSP-1 Einfluss auf Neoangiogenese und mikrovaskuläre Integration ausübt. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Leukozyten-Endothelzellinteraktion zu frühen Beobachtungszeitpunkten nach Implantateinbringung legen nahe, dass die proangiogenen Einflüsse vor allem durch die frühe Immunreaktion vermittelt sind. Dies wird ferner durch die Erkenntnis gestützt, dass bei Immundefizienz kein gesteigerter Einfluss von TSP-1 auf das Gefäßnetz beobachtet werden konnte.

TSP-1 ist in diesem Sinne weder als rein angiogenesfördernder noch als rein angiogenesehemmender Faktor einzuordnen. Die Biomaterialintegration muss als multifaktorieller Prozess verstanden werden, in welchem Angiogenese, Inflammation, Remodellierung und bindegewebige Integration in engem Wechselspiel miteinander stehen. Die im Rückenhautkammermodell gewonnen Erkenntnisse unterstreichen

dabei die Bedeutung der Leukozytenaktivierung für die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten. Sie deuten an, dass endogenes TSP-1 durch eine Förderung der Leukozytenaktivierung die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten positiv beeinflusst.

Die Verwendung von TSP-1 als kontextabhängigen Angiogenesemodulator zur Oberflächenmodifizierung von PPE-Implantaten erscheint in Szenarien der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie zur Korrektur von Malignom bedingten Knochen- und Knorpeldefekten im Kopf-Hals-Bereich interessant, aufgrund der in der Literatur beschriebenen Antagonisierung der im Rahmen der Tumorangio-genese relevanten Faktoren VEGF und FGF-2.

8 Zusammenfassung

Durch Tissue Engineering konnte bereits über unterschiedliche Modifikationen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass sich die Biomaterialintegration von Implantaten aus porösem Polyethylen (PPE) optimieren lässt. Besonders praktikabel erscheinen Strategien, die eine Umhüllung der Implantate mit bioaktiven Stoffen beinhalten.

Das matrizelluläre Protein Thrombospondin-1 (TSP-1) wurde vor dem Hintergrund seiner modulierenden Funktion in der Ausbildung vaskulärer Netzwerke, seiner unterschiedlichen Beeinflussung der extrazellulären Matrix und seiner immunmodulatorischen Eigenschaften auf seine Rolle bei der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten untersucht.

Mittels der Methode der transparenten Rückenhautkammer, die ein etabliertes Angiogenese-Modell darstellt und repetitive intravital-mikroskopische Beobachtung zulässt, wurde der Prozess der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten in C57/Bl6J (Kontrollgruppe) Mäusen (n=8) im Vergleich mit TSP-1^{-/-}(Thbs^{1tm1hyn}/J) Knockout Mäusen (n=8) über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht.

Um valide Ergebnisse zu erzielen, wurde noch ein zweites Angiogenesemodell – der Hen's egg test on chorioallantoic membrane (CAM Assay) - verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TSP-1 die Ausbildung vaskulärer Netzwerke im Rahmen der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten hinsichtlich der Zahl der Gefäßäste und Gefäßverzweigungen pro Fläche im Implantatkörper an Tag 14 und des Anstiegs der funktionellen Gefäßdichte (fvd) im Implantat von Tag 10 auf Tag 14 signifikant beeinträchtigt ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass die frühe gegen den Fremdkörper gerichtete Immunreaktion in Abwesenheit von TSP-1 schwächer ausfällt, was sich in einem signifikant erhöhten Anteil der Fraktionen der statischen Leukozyten und der rollenden Leukozyten an den intravaskulären Leukozyten in der Kontrollgruppe an Beobachtungstag 3 ausdrückt.

Diese beiden Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass endogenes TSP-1 die Biomaterialintegration von PPE-Implantaten stimuliert. Daran anknüpfend wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Oberflächenmodifikation von PPE-Implantaten mit TSP-1 die Biomaterialintegration günstig beeinflussen könnte.

Im CAM Assay wurden zwei weitere Versuchsgruppen gebildet, in welchen eine Oberflächenmodifizierung der PPE-Implantate entweder mit TSP-1 (n=20) oder Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (n=10) erfolgte. Zudem wurden zwei Kontrollgruppen gebildet, die entweder mit 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) (n=13) modifiziert wurden oder unbehandelt blieben (n=7).

In allen Versuchsgruppen war eine proangiogene Reaktion auf die PPE-Implantate nachweisbar. Eine Behandlung mit VEGF-A bewirkte eine signifikante Erhöhung der fvd im Implantatlager gegenüber der Kontrollgruppe an Beobachtungstag 10. Demgegenüber zeigte eine Behandlung mit TSP-1 keinen vergleichbaren Effekt, die fvd entsprach weitgehend den in der mit 0,9% NaCl-Lösung behandelten Kontrollgruppe und den in der unbehandelten Kontrollgruppe gemessenen Werten. Die qualitative Auswertung der Implantatintegration und die Ausfallanalysen der Versuchsgruppen deuten eine gute Verträglichkeit einer Oberflächenbeschichtung mit TSP-1 an.

Die Ergebnisse unterstreichen insgesamt die Bedeutung der initialen Entzündungsreaktion für die erfolgreiche Biomaterialintegration von PPE-Implantaten. Zudem deuten sie an, dass endogenes TSP-1 *in vivo* Einfluss auf die Leukozytenaktivierung in der initialen Inflammationsreaktion gegenüber alloplastischen Fremdmaterialien nimmt.

Die ausgebliebene Stimulation der Angiogenese durch eine Oberflächenmodifizierung mit TSP-1 im methodenimmanent immundefizienten CAM Assay veranschaulicht, dass der zellulär-vermittelten Immunität eine Schlüsselrolle im Prozess der Biomaterialintegration von PPE-Implantaten zukommen könnte. Aus der Gesamtschau der Ergebnisse lässt sich ableiten, dass TSP-1 wahrscheinlich vor allem über das Immunsystem vermittelt Einfluss auf die Implantatvaskularisation ausübt. Diese Effekte könnten langfristig im Feld des Tissue Engineering ausgenutzt werden, gerade weil für TSP-1 gleichzeitig eine Hemmung der Tumorangio-genese beschrieben ist.

9 Literaturverzeichnis

- AAMODT, J. M. & GRAINGER, D. W. 2016. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, 86, 68-82.
- ABAN, I. B. & GEORGE, B. 2015. Statistical considerations for preclinical studies. *Experimental neurology*, 270, 82-87.
- ABDI, H. & WILLIAMS, L. J. 2010. Tukey's honestly significant difference (HSD) test. *Encyclopedia of research design*, 3, 1-5.
- ADA, G. 1990. The immunological principles of vaccination. *The Lancet*, 335, 523-526.
- AISINA, R. B. & MUKHAMETOVA, L. I. 2014. [Structure and functions of plasminogen/plasmin system]. *Bioorg Khim*, 40, 642-57.
- ALGIRE, G. H. 1943. An Adaptation of the Transparent-Chamber Technique to the Mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 4, 1-11.
- ALI, K., TROST, J. G., TRUONG, T. A. & HARSHBARGER, R. J., 3RD 2017. Total Ear Reconstruction Using Porous Polyethylene. *Semin Plast Surg*, 31, 161-172.
- ANDERSON, J. M., RODRIGUEZ, A. & CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 2008. Elsevier, 86-100.
- ANDORKO, J. I. & JEWELL, C. M. 2017. Designing biomaterials with immunomodulatory properties for tissue engineering and regenerative medicine. *Bioengineering & translational medicine*, 2, 139-155.
- AUERBACH, R., LEWIS, R., SHINNERS, B., KUBAI, L. & AKHTAR, N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*, 49, 32-40.
- AUGER, F. A., GIBOT, L. & LACROIX, D. 2013. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 15, 177-200.
- AYALA-DOMINGUEZ, L., OLMEDO-NIEYA, L., MUNOZ-BELLO, J. O., CONTRERAS-PAREDES, A., MANZOMERINO, J., MARTINEZ-RAMIREZ, I. & LIZANO, M. 2019. Mechanisms of Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9.
- AYATA, R. E., CHABAUD, S., AUGER, M. & POULIOT, R. 2015. Behaviour of endothelial cells in a tridimensional in vitro environment. *Biomed Res Int*, 2015, 630461.
- BAIGUERA, S., MACCHIARINI, P. & RIBATTI, D. 2012. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100, 1425-34.
- BARBOSA, J. N. & VASCONCELOS, D. P. 2020. Macrophage response to biomaterials. *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*. Elsevier.
- BATH, K., AGGARWAL, S. & SHARMA, V. 2019. Sushruta: father of plastic surgery in Benares. *Journal of medical biography*, 27, 2-3.
- BELLE, J., YSASI, A., BENNETT, R. D., FILIPOVIC, N., NEJAD, M. I., TRUMPER, D. L., ACKERMANN, M., WAGNER, W., TSUDA, A., KONERDING, M. A. & MENTZER, S. J. 2014. Stretch-induced intussusceptive and sprouting angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Microvasc Res*, 95, 60-7.
- BENEZRA, D., GRIFFIN, B. W., MAFTZIR, G. & AHARONOV, O. 1993. Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34, 3601-3608.
- BENNETT, J. P. 1983. Aspects of the history of plastic surgery since the 16th century. *J R Soc Med*, 76, 152-6.
- BERGER, V. W. & ZHOU, Y. 2014. Kolmogorov–smirnov test: Overview. *Wiley statsref: Statistics reference online*.
- BERGHAUS, A. 1988. *Poröses Polyethylen in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie*, Stuttgart, Hippokrates-Verlag.
- BERGHAUS, A. 2007. Implants for reconstructive surgery of the nose and ears. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 6, Doc06.
- BERGHAUS, A., STELTER, K., NAUMANN, A. & HEMPEL, J. M. 2010. Ear reconstruction with porous polyethylene implants. *Adv Otorhinolaryngol*, 68, 53-64.

- BOEHLER, R. M., GRAHAM, J. G. & SHEA, L. D. 2011. Tissue engineering tools for modulation of the immune response. *Biotechniques*, 51, 239-40, 242, 244 passim.
- BONGRAZIO, M., DA SILVA-AZEVEDO, L., BERGMANN, E. C., BAUM, O., HINZ, B., PRIES, A. R. & ZAKRZEWICZ, A. 2006. Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress-induced angiogenesis in vivo. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 19, 35-48.
- BONNEFOY, A., MOURA, R. & HOYLAERTS, M. F. 2008. Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 713-727.
- BORNSTEIN, P. 1995. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol*, 130, 503-6.
- BORNSTEIN, P. 2009. Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal*, 3, 163-5.
- BRANDES, R., LANG, F. & SCHMIDT, R. F. 2019. *Physiologie des Menschen*, Springer.
- BRODSKY, S., CHEN, J., LEE, A., AKASSOGLU, K., NORMAN, J. & GOLIGORSKY, M. S. 2001. Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1784-92.
- BUHR, C. R., WIESMANN, N., TANNER, R. C., BRIEGER, J. & ECKRICH, J. 2020. The Chorioallantoic Membrane Assay in Nanotoxicological Research-An Alternative for In Vivo Experimentation. *Nanomaterials (Basel)*, 10.
- BURRI, P. H., HLUSHCHUK, R. & DJONOV, V. 2004. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*, 231, 474-88.
- BUSUTTIL, S. J., PLOPLIS, V. A., CASTELLINO, F. J., TANG, L., EATON, J. W. & PLOW, E. F. 2004. A central role for plasminogen in the inflammatory response to biomaterials. *J Thromb Haemost*, 2, 1798-805.
- CANTELMO, A. R., PIRCHER, A., KALUCKA, J. & CARMELIET, P. 2017. Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21, 239-247.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CASANOVA, M. R., OLIVEIRA, C., FERNANDES, E. M., REIS, R. L., SILVA, T. H., MARTINS, A. & NEVES, N. M. 2020. Spatial immobilization of endogenous growth factors to control vascularization in bone tissue engineering. *Biomater Sci*, 8, 2577-2589.
- CHALASANI, R., POOLE-WARREN, L., CONWAY, R. M. & BEN-NISSAN, B. 2007. Porous orbital implants in enucleation: a systematic review. *Surv Ophthalmol*, 52, 145-55.
- CHAMPANERIA, M. C., WORKMAN, A. D. & GUPTA, S. C. 2014. Sushruta: father of plastic surgery. *Annals of plastic surgery*, 73, 2-7.
- CHAPIN, J. C. & HAJJAR, K. A. 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, 29, 17-24.
- CHEN, H., HERNDON, M. E. & LAWLER, J. 2000. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology*, 597-614.
- CHEONG, M. L., LAI, T. H. & WU, W. B. 2019. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen expression in human endometrial stromal cells. *PLoS One*, 14, e0210765.
- CHU, H. & WANG, Y. 2012. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. *Ther Deliv*, 3, 693-714.
- CHUANG, J., BARNES, C. & WONG, B. J. F. 2016. Overview of Facial Plastic Surgery and Current Developments. *Surg J (N Y)*, 2, e17-e28.
- COUNCIL, N. R. 2010. Guide for the care and use of laboratory animals.
- CRAWFORD, S. E., STELLMACH, V., MURPHY-ULLRICH, J. E., RIBEIRO, S. M., LAWLER, J., HYNES, R. O., BOIVIN, G. P. & BOUCK, N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 93, 1159-70.
- CUCCOLO, N. G., ZWIERSTRA, M. J., IBRAHIM, A. M. S., PEYMANI, A., AFSHAR, S. & LIN, S. J. 2019. Reconstruction of Congenital Microtia and Anotia: Analysis of Practitioner Epidemiology and Postoperative Outcomes. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 7, e2318.

- DAWES, J., CLEMETSON, K. J., GOGSTAD, G. O., MCGREGOR, J., CLEZARDIN, P., PROWSE, C. V. & PEPPER, D. S. 1983. A radioimmunoassay for thrombospondin, used in a comparative study of thrombospondin, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in healthy volunteers. *Thromb Res*, 29, 569-81.
- DE SPIEGELAERE, W., CASTELEYN, C., VAN DEN BROECK, W., PLENDL, J., BAHRAMSOLTANI, M., SIMOENS, P., DJONOV, V. & CORNILLIE, P. 2012. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res*, 49, 390-404.
- DEINDL, E., ZIEGELHOFFER, T., KANSE, S. M., FERNANDEZ, B., NEUBAUER, E., CARMELIET, P., PREISSNER, K. T. & SCHAPER, W. 2003. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J*, 17, 1174-6.
- DELL, R. B., HOLLERAN, S. & RAMAKRISHNAN, R. 2002. Sample size determination. *ILAR journal*, 43, 207-213.
- DERYUGINA, E. I. & QUIGLEY, J. P. 2012. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 564259.
- DIPIETRO, L. A., NISSEN, N. N., GAMELLI, R. L., KOCH, A. E., PYLE, J. M. & POLVERINI, P. J. 1996. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *The American journal of pathology*, 148, 1851.
- DO OUTEIRO-BERNSTEIN, M. A. F., NUNES, S. S., ANDRADE, A. C. M., ALVES, T. R., LEGRAND, C. & MORANDI, V. 2002. A recombinant NH2-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biology*, 21, 311-324.
- ECKRICH, J., FRENIS, K., RODRIGUEZ-BLANCO, G., RUAN, Y., JIANG, S., BAYO JIMENEZ, M. T., KUNTIC, M., OELZE, M., HAHAD, O., LI, H., GERICKE, A., STEVEN, S., STRIETH, S., VON KRIEGSHEIM, A., MUNZEL, T., ERNST, B. P. & DAIBER, A. 2021a. Aircraft noise exposure drives the activation of white blood cells and induces microvascular dysfunction in mice. *Redox Biol*, 46, 102063.
- ECKRICH, J., HOORMANN, N., KERSTEN, E., PIRADASHVILI, K., WURM, F. R., HELLER, M., BECKER, S., ANUSIC, T., BRIEGER, J. & STRIETH, S. 2021b. Surface Modification of Porous Polyethylene Implants with an Albumin-Based Nanocarrier-Release System. *Biomedicines*, 9.
- ECKRICH, J., KUGLER, P., BUHR, C. R., ERNST, B. P., MENDLER, S., BAUMGART, J., BRIEGER, J. & WIESMANN, N. 2020. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci Rep*, 10, 18585.
- ECKRICH, J., RUAN, Y., JIANG, S., FRENIS, K., RODRIGUEZ-BLANCO, G., MAAS, A. P., JIMENEZ, M. T. B., KUNTIC, M., OELZE, M. & HAHAD, O. 2021c. In vivo analysis of noise dependent activation of white blood cells and microvascular dysfunction in mice. *MethodsX*, 8, 101540.
- EHRMANTRAUT, S., LASCHKE, M., MERKEL, D., SCHEUER, C., WILLNECKER, V., MEYER-LINDENBERG, A., MENGER, M. & NAUMANN, A. 2010. Perioperative steroid administration inhibits angiogenic host tissue response to porous polyethylene (Medpor) implants. *European Cells & Materials*, 19, 107-116.
- EHRMANTRAUT, S., NAUMANN, A., WILLNECKER, V., AKINYEMI, S., KORBEL, C., SCHEUER, C., MEYER-LINDENBERG, A., MENGER, M. D. & LASCHKE, M. W. 2012. Vitalization of porous polyethylene (Medpor(R)) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng Part A*, 18, 1562-72.
- EILKEN, H. M. & ADAMS, R. H. 2010. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 617-25.
- ENDRICH, B., ASAISHI, K., GOTZ, A. & MESSMER, K. 1980. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*, 177, 125-34.
- ENDRICH, B., ZWEIFACH, B. W., REINHOLD, H. S. & INTAGLIETTA, M. 1979. Quantitative studies of microcirculatory function in malignant tissue: influence of temperature on microvascular hemodynamics during the early growth of the BA 1112 rat sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 5, 2021-30.
- ENDRIGA, M. C. & KAPP-SIMON, K. A. 1999. Psychological issues in craniofacial care: state of the art. *Cleft Palate Craniofac J*, 36, 3-11.

- ESEBANMEN, G. E. & LANGRIDGE, W. H. R. 2017. The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol Res*, 65, 987-994.
- ESTEBAN, S., CLEMENTE, C., KOZIOL, A., GONZALO, P., RIUS, C., MARTINEZ, F., LINARES, P. M., CHAPARRO, M., URZAINQUI, A., ANDRES, V., SEIKI, M., GISBERT, J. P. & ARROYO, A. G. 2020. Endothelial MT1-MMP targeting limits intussusceptive angiogenesis and colitis via TSP1/nitric oxide axis. *Embo Molecular Medicine*, 12.
- FALK, M., HAIN, J., MAROHN, F., FISCHER, H. & MICHEL, R. 2014. *Statistik in Theorie und Praxis: Mit Anwendungen in R*, Springer-Verlag.
- FANG, J., XU, L., LI, Y. & ZHAO, Z. 2016. Roles of TGF-beta 1 signaling in the development of osteoarthritis. *Histol Histopathol*, 31, 1161-7.
- FETZ, A. E., RADIC, M. Z. & BOWLIN, G. L. 2021. Neutrophils in biomaterial-guided tissue regeneration: matrix reprogramming for angiogenesis. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 27, 95-106.
- FILIPOVIC, N., TSUDA, A., LEE, G. S., MIELE, L. F., LIN, M., KONERDING, M. A. & MENTZER, S. J. 2009. Computational flow dynamics in a geometric model of intussusceptive angiogenesis. *Microvasc Res*, 78, 286-93.
- FILIPPI, M. D. 2019. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood*, 133, 2149-2158.
- FLAMME, I., BREIER, G. & RISAU, W. 1995. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*, 169, 699-712.
- FOLKMAN, J. & HOCHBERG, M. 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, 138, 745-53.
- FOUAD, H., ALFOTAWI, R., ALOTHMAN, O. Y., ALSHAMMARI, B. A., ALFAYEZ, M., HASHEM, M. & MAHMOOD, A. 2018. Porous Polyethylene Coated with Functionalized Hydroxyapatite Particles as a Bone Reconstruction Material. *Materials (Basel)*, 11.
- FREITAS-RODRIGUEZ, S., FOLGUERAS, A. R. & LOPEZ-OTIN, C. 2017. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864, 2015-2025.
- GABRIELLI, M. G. & ACCILI, D. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 940741.
- GBYLI, R., MERCALDI, A., SUNDARAM, H. & AMOAKO, K. A. 2018. Achieving totally local anticoagulation on blood contacting devices. *Advanced Materials Interfaces*, 5, 1700954.
- GEORGE, A. L., BANGALORE-PRAKASH, P., RAJORIA, S., SURIANO, R., SHANMUGAM, A., MITTELMAN, A. & TIWARI, R. K. 2011. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol*, 4, 24.
- GERARD, C., BORDELEAU, L. J., BARRALET, J. & DOILLON, C. J. 2010. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials*, 31, 824-31.
- GERMAIN, S., MONNOT, C., MULLER, L. & EICHMANN, A. 2010. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol*, 17, 245-51.
- GOODRICH, J. T., SANDLER, A. L. & TEPPER, O. 2012. A review of reconstructive materials for use in craniofacial surgery bone fixation materials, bone substitutes, and distractors. *Childs Nerv Syst*, 28, 1577-88.
- GOSAU, M., DRAENERT, F. G. & IHRLER, S. 2008. Facial augmentation with porous polyethylene (Medpor)--histological evidence of intense foreign body reaction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 87, 83-7.
- GOSAU, M., SCHIEL, S., DRAENERT, G. F., IHRLER, S., MAST, G. & EHRENFELD, M. 2006. Craniofacial augmentation with porous polyethylene implants (Medpor: first clinical results). *Mund Kiefer Gesichtschir*, 10, 178-84.
- GRECO, M., CIRIACO, A. G., VONELLA, M. & VITAGLIANO, T. 2010. The primacy of the Viano family in the invention of nasal reconstruction technique. *Ann Plast Surg*, 64, 702-5.

- GREIG, A., GOHRITZ, A., GEISHAUSER, M. & MUHLBAUER, W. 2015. Heinrich von Pfalzpaint, Pioneer of Arm Flap Nasal Reconstruction in 1460, More Than a Century Before Tagliacozzi. *J Craniofac Surg*, 26, 1165-8.
- GRESELE, P., MOMI, S. & GUGLIELMINI, G. 2019. Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs. *Biochem Pharmacol*, 166, 300-312.
- GROMAN, E. V. & REINHARDT, C. P. 2004. Method to quantify tail vein injection technique in small animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 43, 35-8.
- HANNAN, R. T., PEIRCE, S. M. & BARKER, T. H. 2017. Fibroblasts: diverse cells critical to biomaterials integration. *ACS biomaterials science & engineering*, 4, 1223-1232.
- HAO, S., SHEN, H., HOU, Y., MARS, W. M. & LIU, Y. 2010. tPA is a potent mitogen for renal interstitial fibroblasts: role of beta1 integrin/focal adhesion kinase signaling. *Am J Pathol*, 177, 1164-75.
- HARRY, L. E. & PALEOLOG, E. M. 2003. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69, 363-74.
- HAVIV, F., BRADLEY, M. F., KALVIN, D. M., SCHNEIDER, A. J., DAVIDSON, D. J., MAJEST, S. M., MCKAY, L. M., HASKELL, C. J., BELL, R. L., NGUYEN, B., MARSH, K. C., SURBER, B. W., UCHIC, J. T., FERRERO, J., WANG, Y. C., LEAL, J., RECORD, R. D., HODDE, J., BADYLAK, S. F., LESNIEWSKI, R. R. & HENKIN, J. 2005. Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J Med Chem*, 48, 2838-46.
- HEIMES, D., WIESMANN, N., ECKRICH, J., BRIEGER, J., MATTYASOVSKY, S., PROFF, P., WEBER, M., DESCHNER, J., AL-NAWAS, B. & KAMMERER, P. W. 2020. In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves. *Int J Mol Sci*, 21.
- HEINEKEN, F. G. & SKALAK, R. 1991. Tissue Engineering - a Brief Overview. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, 113, 111-112.
- HEINRICH, P. C., DEUTZMANN, R. & BRUCKNER, P. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- HERTER, J. & ZARBOCK, A. 2013. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol*, 190, 4451-7.
- HESSNAUER, M. E. T., LAUBER, K., ZUCHTRIEGEL, G., UHL, B., HUSSAIN, T., CANIS, M., STRIETH, S., BERGHAUS, A. & REICHEL, C. A. 2018. Vitronectin promotes the vascularization of porous polyethylene biomaterials. *Acta Biomater*, 82, 24-33.
- HICKEY, A. J. & SALTER, M. 2006. Prosthodontic and psychological factors in treating patients with congenital and craniofacial defects. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 95, 392-396.
- HILLIG, U. 1991. [Cheilognathopalatoschisis: its classification and epidemiology]. *Fortschr Kieferorthop*, 52, 230-6.
- HOORMANN, N. 2020. *Albumin-Nanopartikel als Drug Delivery System zur Oberflächenmodifikation poröser Polyethylenimplantate*. Dissertation, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2020.
- HUSSAIN, T., GELLRICH, D., SIEMER, S., REICHEL, C. A., ECKRICH, J., DIETRICH, D., KNAUER, S. K., STAUBER, R. H. & STRIETH, S. 2021. TNF-alpha-Inhibition Improves the Biocompatibility of Porous Polyethylene Implants In Vivo. *Tissue Eng Regen Med*, 18, 297-303.
- HUSSAIN, T., SCHNEIDER, M., SUMMER, B. & STRIETH, S. 2016. Pre-operative in vitro fibroblast coating of porous polyethylene compound grafts - Cell survival in vivo and effects on biocompatibility. *Biomed Mater Eng*, 27, 237-49.
- ICHA, J., WEBER, M., WATERS, J. C. & NORDEN, C. 2017. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *Bioessays*, 39.
- INGRAHAM, F. D., ALEXANDER, E., JR. & MATSON, D. D. 1947. Polyethylene, a new synthetic plastic for use in surgery; experimental applications in neurosurgery. *J Am Med Assoc*, 135, 82-7.
- IRUELA-ARISPE, M. L., LOMBARDO, M., KRUTZSCH, H. C., LAWLER, J. & ROBERTS, D. D. 1999. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation*, 100, 1423-31.
- ISMAIL, A. A., SHAKER, B. T. & BAJOU, K. 2021. The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 23.

- JAKOB, W., JENTZSCH, K. D., MAUERSBERGER, B. & HEDER, G. 1978. The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. *Exp Pathol (Jena)*, 15, 241-9.
- JULIER, Z., PARK, A. J., BRIQUEZ, P. S. & MARTINO, M. M. 2017. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater*, 53, 13-28.
- JUNG, S. K., CHO, W. K., PAIK, J. S. & YANG, S. W. 2012. Long-term surgical outcomes of porous polyethylene orbital implants: a review of 314 cases. *Br J Ophthalmol*, 96, 494-8.
- KESELOWSKY, B. G., BRIDGES, A. W., BURNS, K. L., TATE, C. C., BABENSEE, J. E., LAPLACA, M. C. & GARCIA, A. J. 2007. Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials. *Biomaterials*, 28, 3626-31.
- KIM, H. Y. 2017a. Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restor Dent Endod*, 42, 152-155.
- KIM, J.-K., LEE, S.-B. & YANG, S.-Y. 2018. Cranioplasty Using Autologous Bone versus Porous Polyethylene versus Custom-Made Titanium Mesh : A Retrospective Review of 108 Patients. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 61, 737-746.
- KIM, T. K. 2017b. Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. *Korean journal of anesthesiology*, 70, 22.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378-86.
- KOCH, M. 2012. *Die Bedeutung von Thrombospondin-1 für den chondrozytären Phänotyp*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Germany).
- KOHLI, N., SAWADKAR, P., HO, S., SHARMA, V., SNOW, M., POWELL, S., WOODRUFF, M. A., HOOK, L. & GARCIA-GARETA, E. 2020. Pre-screening the intrinsic angiogenic capacity of biomaterials in an optimised ex ovo chorioallantoic membrane model. *J Tissue Eng*, 11, 2041731420901621.
- KROTH, J., WEIDLICH, K., HIEDL, S., NUSSBAUM, C., CHRIST, F. & GENZEL-BOROVICZENY, O. 2008. Functional vessel density in the first month of life in preterm neonates. *Pediatric research*, 64, 567-571.
- KUNDEKOVÁ, B., MÁČAJOVÁ, M., META, M., ČAVARGA, I. & BILČÍK, B. 2021. Chorioallantoic Membrane Models of Various Avian Species: Differences and Applications. *Biology*, 10, 301.
- KUPILAS, F. & KLEINHEINZ, J. 2019. Kombination unterschiedlicher Versorgungsmöglichkeiten zur Defektdeckung im exponierten Gesichtsbereich. *Journal für Ästhetische Chirurgie*, 12, 151-156.
- KYRIAKIDES, T. R. & MACLAUHLAN, S. 2009. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. *Journal of cell communication and signaling*, 3, 215-225.
- KZHYSKOWSKA, J., GUDIMA, A., RIABOV, V., DOLLINGER, C., LAVALLE, P. & VRANA, N. E. 2015. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. *Journal of leukocyte biology*, 98, 953-962.
- LANGER, H. F. & CHAVAKIS, T. 2009. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med*, 13, 1211-20.
- LANGER, S., SINITSINA, I., BIBERTHALER, P., KROMBACH, F. & MESSMER, K. 2002. Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Annals of plastic surgery*, 48, 53-59.
- LASCHKE, M. W., AUGUSTIN, V., KLEER, S., TSCHERNIG, T. & MENGER, M. D. 2014. Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor(R)). *Acta Biomater*, 10, 4661-4669.
- LASCHKE, M. W., AUGUSTIN, V. A., SAHIN, F., ANSCHUTZ, D., METZGER, W., SCHEUER, C., BISCHOFF, M., AKTAS, C. & MENGER, M. D. 2016. Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor((R))) implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 104, 1738-1748.
- LASCHKE, M. W. & MENGER, M. D. 2012. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res*, 48, 85-92.

- LASCHKE, M. W. & MENGER, M. D. 2016a. The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater*, 32, 202-15.
- LASCHKE, M. W. & MENGER, M. D. 2016b. Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions. *Biotechnology advances*, 34, 112-121.
- LASCHKE, M. W., RÜCKER, M., JENSEN, G., CARVALHO, C., MÜLHAUPT, R., GELLRICH, N.-C. & MENGER, M. D. 2008. Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Annals of surgery*, 248, 939-948.
- LASCHKE, M. W., VOLLMAR, B. & MENGER, M. D. 2011. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater*, 22, 147-64; discussion 164-7.
- LAUX, V. & SEIFFGE, D. 1993. Platelet function in the dorsal skin fold chamber of the rat. *In Vivo*, 7, 45-51.
- LAWLER, J. 2002. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 6, 1-12.
- LAWLER, J., SUNDAY, M., THIBERT, V., DUQUETTE, M., GEORGE, E. L., RAYBURN, H. & HYNES, R. O. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest*, 101, 982-92.
- LAWLER, P. R. & LAWLER, J. 2012. Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a006627-a006627.
- LEHR, H. A., LEUNIG, M., MENGER, M. D., NOLTE, D. & MESSMER, K. 1993. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*, 143, 1055-62.
- LI, D., CHIN, W., WU, J., ZHANG, Q., XU, F., XU, Z. & ZHANG, R. 2010. Psychosocial outcomes among microtia patients of different ages and genders before ear reconstruction. *Aesthetic plastic surgery*, 34, 570-576.
- LI, M., PATHAK, R. R., LOPEZ-RIVERA, E., FRIEDMAN, S. L., AGUIRRE-GHISO, J. A. & SIKORA, A. G. 2015. The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. *J Vis Exp*.
- LI, Y., QI, X., TONG, X. & WANG, S. 2013. Thrombospondin 1 activates the macrophage Toll-like receptor 4 pathway. *Cell Mol Immunol*, 10, 506-12.
- LIEGSALZ-BECK, V. M. 2016. *Neue Aspekte des Beta2-integrinvermittelten Crawlings von Leukozyten dargestellt anhand von in vivo-Multiphotonenmikroskopie*. Technische Universität München.
- LOKMAN, N. A., ELDER, A. S., RICCIARDELLI, C. & OEHLER, M. K. 2012. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*, 13, 9959-70.
- LONGSTAFF, C. & KOLEV, K. 2015. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*, 13 Suppl 1, S98-105.
- LOPEZ-DEE, Z., PIDCOCK, K. & GUTIERREZ, L. S. 2011. Thrombospondin-1: Multiple Paths to Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2011, 1-10.
- LORDA-DIEZ, C. I., GARCIA-RIART, B., MONTERO, J. A., RODRIGUEZ-LEÓN, J., GARCIA-PORRERO, J. A. & HURLE, J. M. 2015. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Albany NY)*, 7, 974.
- LOROT-MARCHAND, A., GUERRESCHI, P., PELLERIN, P., MARTINOT, V., GBAGUIDI, C. C., NEIVA, C., DEVAUCHELLE, B., FROCHISSE, C., POLI-MEROL, M. L. & FRANCOIS-FIQUET, C. 2015. Frequency and socio-psychological impact of taunting in school-age patients with cleft lip-palate surgical repair. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79, 1041-1048.
- LUQUETTI, D. V., HEIKE, C. L., HING, A. V., CUNNINGHAM, M. L. & COX, T. C. 2012. Microtia: epidemiology and genetics. *Am J Med Genet A*, 158A, 124-39.
- MACLEOD, M. R., FISHER, M., O'COLLINS, V., SENA, E. S., DIRNAGL, U., BATH, P. M., BUCHAN, A., VAN DER WORP, H. B., TRAYSTMAN, R. & MINEMATSU, K. 2009. Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench. *Stroke*, 40, e50-e52.

- MAJOR, M. R., WONG, V. W., NELSON, E. R., LONGAKER, M. T. & GURTNER, G. C. 2015. The foreign body response: at the interface of surgery and bioengineering. *Plast Reconstr Surg*, 135, 1489-1498.
- MALARD, O., ESPITALIER, F., BORDURE, P., DACULSI, G., WEISS, P. & CORRE, P. 2007. Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck. *Expert Review of Medical Devices*, 4, 729-739.
- MANGIR, N., DIKICI, S., CLAEYSSENS, F. & MACNEIL, S. 2019. Using ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng*, 5, 3190-3200.
- MANTUANO, E., AZMOON, P., BRIFAUULT, C., BANKI, M. A., GILDER, A. S., CAMPANA, W. M. & GONIAS, S. L. 2017. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. *Blood*, 130, 1364-1374.
- MARIANI, E., LISIGNOLI, G., BORZÌ, R. M. & PULSATELLI, L. 2019. Biomaterials: foreign bodies or tuners for the immune response? *International journal of molecular sciences*, 20, 636.
- MARSHALL, K. M., KANCZLER, J. M. & OREFFO, R. O. 2020. Evolving applications of the egg: chorioallantoic membrane assay and ex vivo organotypic culture of materials for bone tissue engineering. *J Tissue Eng*, 11, 2041731420942734.
- MARTIN-MANSO, G., NAVARATHNA, D. H., GALLI, S., SOTO-PANTOJA, D. R., KUZNETSOVA, S. A., TSOKOS, M. & ROBERTS, D. D. 2012. Endogenous thrombospondin-1 regulates leukocyte recruitment and activation and accelerates death from systemic candidiasis. *PLoS One*, 7, e48775.
- MAZZOLA, I. C. & MAZZOLA, R. F. 2014. History of reconstructive rhinoplasty. *Facial Plast Surg*, 30, 227-36.
- MCKNIGHT, P. E. & NAJAB, J. 2010. Mann-Whitney U Test. *The Corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.
- MENGER, M. D., LASCHKE, M. W. & VOLLMAR, B. 2002. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res*, 34, 83-91.
- MENTZER, S. J. & KONERDING, M. A. 2014. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 17, 499-509.
- MERCKX, G., TAY, H., LO MONACO, M., VAN ZANDVOORT, M., DE SPIEGELAERE, W., LAMBRICHTS, I. & BRONCKAERS, A. 2020. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev*, 26, 519-539.
- MILLER, W. J., KAYTON, M. L., PATTON, A., O'CONNOR, S., HE, M., VU, H., BAIBAKOV, G., LORANG, D., KNEZEVIC, V., KOHN, E., ALEXANDER, H. R., STIRLING, D., PAYVANDI, F., MULLER, G. W. & LIBUTTI, S. K. 2004. A novel technique for quantifying changes in vascular density, endothelial cell proliferation and protein expression in response to modulators of angiogenesis using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. *J Transl Med*, 2, 4.
- MONROY, A., KOJIMA, K., GHANEM, M. A., PAZ, A. C., KAMIL, S., VACANTI, C. A. & EAVEY, R. D. 2007. Tissue engineered cartilage "bioshell" protective layer for subcutaneous implants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71, 547-52.
- MOON, B. J., LEE, H. J. & JANG, Y. J. 2012. Outcomes following rhinoplasty using autologous costal cartilage. *Arch Facial Plast Surg*, 14, 175-80.
- MOORE, E. M. & WEST, J. L. 2019. Harnessing macrophages for vascularization in tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, 47, 354-365.
- MORAIS, J. M., PAPADIMITRAKOPOULOS, F. & BURGESS, D. J. 2010. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS journal*, 12, 188-196.
- MORENO-JIMENEZ, I., HULSART-BILLSTROM, G., LANHAM, S. A., JANECZEK, A. A., KONTOULI, N., KANCZLER, J. M., EVANS, N. D. & OREFFO, R. O. 2016. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. *Sci Rep*, 6, 32168.
- MOSHAVER, A. & GANTOUS, A. 2007. The use of autogenous costal cartilage graft in septorhinoplasty. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 137, 862-7.

- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 8, 958-969.
- MOY, A. J., WHITE, S. M., INDRAWAN, E. S., LOTFI, J., NUDELMAN, M. J., COSTANTINI, S. J., AGARWAL, N., JIA, W., KELLY, K. M., SORG, B. S. & CHOI, B. 2011. Wide-field functional imaging of blood flow and hemoglobin oxygen saturation in the rodent dorsal window chamber. *Microvasc Res*, 82, 199-209.
- MÜLLER-ESTERL, W. 2017. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*, Springer Berlin Heidelberg.
- MURPHY-ULLRICH, J. E. & SAGE, E. H. 2014. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol*, 37, 1-14.
- MURPHY-ULLRICH, J. E. & SUTO, M. J. 2018. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF-beta activation: A therapeutic target for fibrotic disease. *Matrix Biol*, 68-69, 28-43.
- NAIK, M. N., MURTHY, R. K. & HONAVAR, S. G. 2007. Comparison of vascularization of Medpor and Medpor-Plus orbital implants: a prospective, randomized study. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 23, 463-7.
- NAITO, H., IBA, T. & TAKAKURA, N. 2020. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *International Immunology*, 32, 295-305.
- NAJAFI, M., FARHOOD, B. & MORTEZAEI, K. 2019. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem*, 120, 2782-2790.
- NARAYAN, D. & ARIYAN, S. 2001. Surgical considerations in the management of malignant melanoma of the ear. *Plast Reconstr Surg*, 107, 20-4.
- NARIZHNEVA, N. V., RAZORENOVA, O. V., PODREZ, E. A., CHEN, J., CHANDRASEKHARAN, U. M., DICORLETO, P. E., PLOW, E. F., TOPOL, E. J. & BYZOVA, T. V. 2005. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 1158-1160.
- NICHOLSON, L. B. 2016. The immune system. *Essays Biochem*, 60, 275-301.
- NIECHAJEV, I. 2012. Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (medpor): long-term results. *Aesthetic Plast Surg*, 36, 917-27.
- NOR, J. E., JAWORSKI, D. D., MITRA, R. & POLVERINI, P. J. 1997. Thrombospondin-1 inhibits angiogenesis by inducing endothelial cell apoptosis. *Journal of Dental Research*, 76, 73-73.
- NOWAK-SLIWINSKA, P., ALITALO, K., ALLEN, E., ANISIMOV, A., APLIN, A. C., AUERBACH, R., AUGUSTIN, H. G., BATES, D. O., VAN BEIJNUM, J. R., BENDER, R. H. F., BERGERS, G., BIKFALVI, A., BISCHOFF, J., BOCK, B. C., BROOKS, P. C., BUSSOLINO, F., CAKIR, B., CARMELIET, P., CASTRANOVA, D., CIMPEAN, A. M., CLEAVER, O., COUKOS, G., DAVIS, G. E., DE PALMA, M., DIMBERG, A., DINGS, R. P. M., DJONOV, V., DUDLEY, A. C., DUFTON, N. P., FENDT, S. M., FERRARA, N., FRUTTIGER, M., FUKUMURA, D., GHESQUIERE, B., GONG, Y., GRIFFIN, R. J., HARRIS, A. L., HUGHES, C. C. W., HULTGREN, N. W., IRUELA-ARISPE, M. L., IRVING, M., JAIN, R. K., KALLURI, R., KALUCKA, J., KERBEL, R. S., KITAJEWSKI, J., KLAASSEN, I., KLEINMANN, H. K., KOOLWIJK, P., KUCZYNSKI, E., KWAK, B. R., MARIEN, K., MELERO-MARTIN, J. M., MUNN, L. L., NICOSIA, R. F., NOEL, A., NURRO, J., OLSSON, A. K., PETROVA, T. V., PIETRAS, K., PILI, R., POLLARD, J. W., POST, M. J., QUAX, P. H. A., RABINOVICH, G. A., RAICA, M., RANDI, A. M., RIBATTI, D., RUEGG, C., SCHLINGEMANN, R. O., SCHULTE-MERKER, S., SMITH, L. E. H., SONG, J. W., STACKER, S. A., STALIN, J., STRATMAN, A. N., VAN DE VELDE, M., VAN HINSBERGH, V. W. M., VERMEULEN, P. B., WALTENBERGER, J., WEINSTEIN, B. M., XIN, H., YETKIN-ARIK, B., YLA-HERTTUALA, S., YODER, M. C. & GRIFFIOEN, A. W. 2018. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 21, 425-532.
- NOWAK-SLIWINSKA, P., SEGURA, T. & IRUELA-ARISPE, M. L. 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17, 779-804.
- OCHOA, C. D., YU, L., AL-ANSARI, E., HALES, C. A. & QUINN, D. A. 2010. Thrombospondin-1 null mice are resistant to hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Cardiothorac Surg*, 5, 32.
- OSTERTAGOVA, E., OSTERTAG, O. & KOVÁČ, J. Methodology and application of the Kruskal-Wallis test. *Applied Mechanics and Materials*, 2014. Trans Tech Publ, 115-120.

- PAPENFUSS, H. D., GROSS, J. F., INTAGLIETTA, M. & TREESE, F. A. 1979. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res*, 18, 311-8.
- PARK, B. W., YANG, H. S., BAEK, S. H., PARK, K., HAN, D. K. & LEE, T. S. 2007. The efficacy of acrylic acid grafting and arginine-glycine-aspartic acid peptide immobilization on fibrovascular ingrowth into porous polyethylene implants in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245, 855-62.
- PAXTON, N. C., ALLENBY, M. C., LEWIS, P. M. & WOODRUFF, M. A. 2019. Biomedical applications of polyethylene. *European Polymer Journal*, 118, 412-428.
- PETRI, B., PHILLIPSON, M. & KUBES, P. 2008. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*, 180, 6439-46.
- PINET, K. & MCLAUGHLIN, K. A. 2019. Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals: Manipulating tissue, organ, and organism morphology. *Developmental biology*, 451, 134-145.
- PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., LOFTUS, J. & SMITH, J. W. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275, 21785-8.
- RAMASWAMY, A. K., VORP, D. A. & WEINBAUM, J. S. 2019. Functional Vascular Tissue Engineering Inspired by Matricellular Proteins. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6.
- REICHEL, C. A., HESSENAUER, M. E., PFLIEGER, K., REHBERG, M., KANSE, S. M., ZAHLER, S., KROMBACH, F., BERGHAUS, A. & STRIETH, S. 2015. Components of the plasminogen activation system promote engraftment of porous polyethylene biomaterial via common and distinct effects. *PLoS One*, 10, e0116883.
- RENDEL, E. S., HAMDOLLAH-ZADEH, M. A., WHEATLEY, E. R., MAGNUSSEN, A., SCHULER, Y., KELLY, S. P., FINUCANE, C., ELLISON, D., CEBE-SUAREZ, S., BALLMER-HOFER, K., MATHER, S., STEWART, L., BATES, D. O. & HARPER, S. J. 2008. Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer*, 44, 1883-94.
- RIBATTI, D. 2017. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*, 70, 97-101.
- RIBATTI, D. & CRIVELLATO, E. 2012. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology*, 372, 157-165.
- RIDWAN-PRAMANA, A., WOLFF, J., RAZIEI, A., ASHTON-JAMES, C. E. & FOROUZANFAR, T. 2015. Porous polyethylene implants in facial reconstruction: Outcome and complications. *J Craniomaxillofac Surg*, 43, 1330-4.
- ROSINI, S., PUGH, N., BONNA, A., HULMES, D., FARNDAL, R. & ADAMS, J. 2018. Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites. *Science Signaling*, 11, 532.
- RUBIN, L. R., ROBERTSON, G. W. & SHAPIRO, R. N. 1948. Polyethelene in reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg (1946)*, 3, 586-93.
- RUCKER, M., LASCHKE, M. W., JUNKER, D., CARVALHO, C., SCHRAMM, A., MULHAUPT, R., GELLRICH, N. C. & MENGER, M. D. 2006. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27, 5027-38.
- RUMNEY, R. M. H., LANHAM, S. A., KANCZLER, J. M., KAO, A. P., THIAGARAJAN, L., DIXON, J. E., TOZZI, G. & OREFFO, R. O. C. 2019. In vivo delivery of VEGF RNA and protein to increase osteogenesis and intraosseous angiogenesis. *Sci Rep*, 9, 17745.
- RUSNATI, M., URBINATI, C., BONIFACIO, S., PRESTA, M. & TARABOLETTI, G. 2010. Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3, 1241-1278.
- SABAN, D. R., BOCK, F., CHAUHAN, S. K., MASLI, S. & DANA, R. 2010. Thrombospondin-1 derived from APCs regulates their capacity for allosensitization. *J Immunol*, 185, 4691-7.
- SABINI, P., SCLAFANI, A. P., ROMO, T. R., MCCORMICK, S. A. & COCKER, R. 2000. Modulation of tissue ingrowth into porous high-density polyethylene implants with basic fibroblast growth factor and autologous blood clot. *Archives of facial plastic surgery*, 2, 27-33.
- SAJJADIAN, A., RUBINSTEIN, R. & NAGHSHINEH, N. 2010. Current status of grafts and implants in rhinoplasty: part I. Autologous grafts. *Plast Reconstr Surg*, 125, 40e-49e.

- SALTZMAN, W. M. & OLBRICHT, W. L. 2002. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 177-86.
- SANDISON, J. C. 1928. The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope. *American Journal of Anatomy*, 41, 447-473.
- SARKER, M., CHEN, X. B. & SCHREYER, D. J. 2015. Experimental approaches to vascularisation within tissue engineering constructs. *J Biomater Sci Polym Ed*, 26, 683-734.
- SARTORE, L., LANCEROTTO, L., SALMASO, M., GIATSIDIS, G., PACCAGNELLA, O., ALAIBAC, M. & BASSETTO, F. 2011. Facial basal cell carcinoma: analysis of recurrence and follow-up strategies. *Oncol Rep*, 26, 1423-9.
- SCHNEIDER-STOCK, R. & RIBATTI, D. 2021. The CAM Assay as an Alternative In Vivo Model for Drug Testing. *Handb Exp Pharmacol*, 265, 303-323.
- SCHOCH, A., THOREY, I. S., ENGERT, J., WINTER, G. & EMRICH, T. 2014. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus routes of antibody administration in pharmacokinetic studies. *Lab Anim (NY)*, 43, 95-9.
- SCHREITER, J., MEYER, S., SCHMIDT, C., SCHULZ, R. M. & LANGER, S. 2017. Dorsal skinfold chamber models in mice. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*, 6, Doc10.
- SCKELL, A. & LEUNIG, M. 2009. The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods Mol Biol*, 467, 305-17.
- SCLAFANI, A. P., ROMO, T., 3RD, UKRAINSKY, G., MCCORMICK, S. A., LITNER, J., KEVY, S. V. & JACOBSON, M. S. 2005. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Arch Facial Plast Surg*, 7, 163-9.
- SELDERS, G. S., FETZ, A. E., RADIC, M. Z. & BOWLIN, G. L. 2017. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials*, 4, 55-68.
- SENGUPTA, P., SURWASE, S. S. & PRASAD, B. L. 2018. Modification of porous polyethylene scaffolds for cell attachment and proliferation. *Int J Nanomedicine*, 13, 87-90.
- SIMPSON, D. A. & DAVID, D. J. 2004. Herbert Moran Memorial Lecture. World War I: the genesis of craniomaxillofacial surgery? *ANZ J Surg*, 74, 71-7.
- SINGH, S., WU, B. M. & DUNN, J. C. 2012. Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis. *J Biomed Mater Res A*, 100, 720-7.
- SINGH, V. P. & MOSS, T. P. 2015. Psychological impact of visible differences in patients with congenital craniofacial anomalies. *Prog Orthod*, 16, 5.
- SONG, I. & DITYATEV, A. 2018. Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain research bulletin*, 136, 101-108.
- SONG, X., LI, L., SUN, Y., FAN, X. & LI, Z. 2016. Long-term infectious complications of using porous polyethylene mesh for orbital fracture reconstruction. *Medicine (Baltimore)*, 95, e3819.
- SOPARKAR, C. N., WONG, J. F., PATRINELY, J. R. & APPLING, D. 2000. Epidermal and fibroblast growth factors enhance fibrovascular integration of porous polyethylene implants. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, 16, 337-340.
- SPÄTER, T., MENGER, M. D. & LASCHKE, M. W. 2021. Vascularization strategies for porous polyethylene implants. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 27, 29-38.
- SPÄTER, T., TOBIAS, A. L., MENGER, M. M., NICKELS, R. M., MENGER, M. D. & LASCHKE, M. W. 2020. Biological coating with platelet-rich plasma and adipose tissue-derived microvascular fragments improves the vascularization, biocompatibility and tissue incorporation of porous polyethylene. *Acta Biomater*, 108, 194-206.
- SPILLER, K. L., ANFANG, R. R., SPILLER, K. J., NG, J., NAKAZAWA, K. R., DAULTON, J. W. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2014. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 35, 4477-4488.
- SPILLER, K. L., NASSIRI, S., WITHEREL, C. E., ANFANG, R. R., NG, J., NAKAZAWA, K. R., YU, T. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2015. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the

- M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials*, 37, 194-207.
- STEFANSSON, S. & LAWRENCE, D. A. 2003. Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration. *Sci STKE*, 2003, pe24.
- STELTER, K., STRIETH, S. & BERGHAUS, A. 2007. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*, 45, 325-331.
- STEPHAN, S. & REINISCH, J. 2018. Auricular Reconstruction Using Porous Polyethylene Implant Technique. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 26, 69-85.
- STRIETH, S. 2013. Tissue-Engineering mit porösen Polyethylenimplantaten. *Hno*, 61, 211-216.
- STRIETH, S., WEGER, T., BARTESCH, C., BITTMANN, P., STELTER, K. & BERGHAUS, A. 2010. Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater Res A*, 93, 1566-73.
- STYP-REKOWSKA, B., HLUSHCHUK, R., PRIES, A. R. & DJONOV, V. 2011. Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow. *Acta Physiol (Oxf)*, 202, 213-23.
- SWITALSKA, H. I., NIEWIAROWSKI, S., TUSZYNSKI, G. P., RUCINSKI, B., SCHMAIER, A. H., MORINELLI, T. A. & CIERNIEWSKI, C. S. 1985. Radioimmunoassay of human platelet thrombospondin: different patterns of thrombospondin and beta-thromboglobulin antigen secretion and clearance from the circulation. *J Lab Clin Med*, 106, 690-700.
- TABATA, I. I. 2000. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharm Sci Technol Today*, 3, 80-89.
- TANG, L., THEVENOT, P. & HU, W. 2008. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry*, 8, 270-280.
- TANG, M., ZHOU, F., ZHANG, W., GUO, Z., SHANG, Y., LU, H., LU, R., ZHANG, Y., CHEN, Y. & ZHONG, M. 2011. The role of thrombospondin-1-mediated TGF-beta1 on collagen type III synthesis induced by high glucose. *Mol Cell Biochem*, 346, 49-56.
- TANNENBAUM, J. & BENNETT, B. T. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54, 120-132.
- TSAI, P. P., SCHLICHTIG, A., ZIEGLER, E., ERNST, H., HABERSTROH, J., STELZER, H. D. & HACKBARTH, H. 2015. Effects of different blood collection methods on indicators of welfare in mice. *Lab Anim (NY)*, 44, 301-10.
- VARADHARAJAN, K., SETHUKUMAR, P., ANWAR, M. & PATEL, K. 2015. Complications Associated With the Use of Autologous Costal Cartilage in Rhinoplasty: A Systematic Review. *Aesthet Surg J*, 35, 644-52.
- VASCONCELOS, D. P., ÁGUAS, A. P., BARBOSA, M. A., PELEGRÍN, P. & BARBOSA, J. N. 2019. The inflammasome in host response to biomaterials: bridging inflammation and tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 83, 1-12.
- VERSTEEG, H. H., HEEMSKERK, J. W., LEVI, M. & REITSMA, P. H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews*, 93, 327-358.
- VON GRÄFE, C. F. 1818. *Rhinoplastik oder die Kunst den Verlust der Nase organisch zu ersetzen: in ihren früheren Verhältnissen erforscht und durch neue Verfahrensweisen zu höheren Vollkommenheit gefördert; Mit sechs Kupfertafeln*, Realschulbuchhandlung.
- WANG, M., HENCH, L. & BONFIELD, W. 1998. Bioglass®/high density polyethylene composite for soft tissue applications: Preparation and evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42, 577-586.
- WEE, J. H., PARK, M. H., OH, S. & JIN, H. R. 2015. Complications associated with autologous rib cartilage use in rhinoplasty: a meta-analysis. *JAMA Facial Plast Surg*, 17, 49-55.
- WHITEFORD, J. R., DE ROSSI, G. & WOODFIN, A. 2016. Mutually Supportive Mechanisms of Inflammation and Vascular Remodeling. *Int Rev Cell Mol Biol*, 326, 201-78.
- WILLIAMS, D. F. 2009. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30, 5897-909.
- WILLIAMS, D. F. 2019. Challenges with the development of biomaterials for sustainable tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 127.

- WORTHINGTON, J. J., FENTON, T. M., CZAJKOWSKA, B. I., KLEMENTOWICZ, J. E. & TRAVIS, M. A. 2012. Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology*, 217, 1259-65.
- YANG, D., LU, X., HONG, Y., XI, T. & ZHANG, D. 2013. The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials. *Biomaterials*, 34, 5747-58.
- YANG, H. C., CHO, H. H., JO, S. Y., JANG, C. H. & CHO, Y. B. 2015. Donor-site morbidity following minimally invasive costal cartilage harvest technique. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 8, 13-9.
- YAREMCHUK, M. J. 2003. Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg*, 111, 1818-27.
- ZHANG, K. J., LI, M. M., YIN, L., FU, G. S. & LIU, Z. J. 2020. Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 45, 1275-1293.
- ZHANG, Y., SUN, T. & JIANG, C. 2018. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharm Sin B*, 8, 34-50.
- ZHAO, C., ISENBERG, J. S. & POPEL, A. S. 2018. Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22, 2086-2097.
- ZHOU, G. & GROTH, T. 2018. Host Responses to Biomaterials and Anti-Inflammatory Design-a Brief Review. *Macromol Biosci*, 18, e1800112.
- ZHU, Y., MA, Z., KONG, L., HE, Y., CHAN, H. F. & LI, H. 2020. Modulation of macrophages by bioactive glass/sodium alginate hydrogel is crucial in skin regeneration enhancement. *Biomaterials*, 256, 120216.
- ZWADLO-KLARWASSER, G., GORLITZ, K., HAFEMANN, B., KLEE, D. & KLOSTERHALFEN, B. 2001. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*, 12, 195-9.

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tabelle 1: CAM Assay / Integrationsgrade an Versuchstag 7.....	70
Tabelle 2: CAM Assay / Integrationsgrade an Versuchstag 10.....	70
Tabelle 3: DSC / Exemplarischer Dokumentationsbogen Tierversuch	99
Tabelle 4: DSC / TSP-1-K.O. / funktionelle Gefäßdichte im Implantat	101
Tabelle 5: DSC / Wildtyp / funktionelle Gefäßdichte im Implantat.....	101
Tabelle 6: DSC / TSP-1-K.O. / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat	102
Tabelle 7: DSC / Wildtyp / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat	102
Tabelle 8: DSC / TSP-1-K.O. / funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager	102
Tabelle 9: DSC / Wildtyp / funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager	103
Tabelle 10: DSC / TSP-1-K.O. / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager ..	103
Tabelle 11: DSC / Wildtyp / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager	103
Tabelle 12: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 3	104
Tabelle 13: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 7	105
Tabelle 14: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 10.....	106
Tabelle 15: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 3	107
Tabelle 16: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 7	108
Tabelle 17: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 10	109
Tabelle 18: DSC / TSP-1-K.O. / Dynamische Desintegrationskraft.....	109
Tabelle 19: DSC / Versuchsgruppenanalyse.....	109
Tabelle 20: CAM Assay / TSP-1 / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7	111
Tabelle 21: CAM Assay / TSP-1 / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10	111
Tabelle 22: CAM Assay / VEGF-A / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7	112
Tabelle 23: CAM Assay / VEGF-A / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10	112
Tabelle 24: CAM Assay / NaCl / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7	113
Tabelle 25: CAM Assay / NaCl / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10	113
Tabelle 26: CAM Assay / Kontrollgruppe / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7.....	114
Tabelle 27: CAM Assay / Kontrollgruppe / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10.....	114
Tabelle 28: CAM Assay / TSP-1 / Versuchsgruppenanalyse.....	115
Tabelle 29: CAM Assay / VEGF-A / Versuchsgruppenanalyse.....	118
Tabelle 30: CAM Assay / NaCl / Versuchsgruppenanalyse	121
Tabelle 31: CAM Assay / Kontrollgruppe / Versuchsgruppenanalyse.....	124

Tabelle 3: DSC / Exemplarischer Dokumentationsbogen Tierversuch

Versuchstier	BRI-283		OP erfolgreich?	Ja	
Ohr Nr.	C57BL/6 J				
Datum der OP	07.08.18				
KG prä-OP [g]	32				
KG post-Op [+ Kammer]	33				
Versuchstag - 1					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Appl-Dos. Fluxinin [ml]	Dosis Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	34	0,001	0,003	Nein	
Versuchstag 0					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	34	0,001	0,003	Nein	
Polyethylen erfolgreich implantiert?		Ja			
Versuchstag 1					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	31	0,001	0,003	Nein	
Versuchstag 2					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	32	0,001	0,003	Nein	
Versuchstag 3					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	33	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 4					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkunge n
Ja	31	0,001	0,000	Nein	

Versuchstag 5					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 6					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	30	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 7					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	33	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 8					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 9					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 10					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	32	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 11					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 12					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 13					

Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	31	0,001	0,000	Nein	
Versuchstag 14					
Tier lebendig	Gewicht [g]	Fluxinin [ml]	Marbofloxacin [ml]	Auffälligkeiten ?	Bemerkungen
Ja	32	0,001	0,000	Nein	
Gewichtsverlust im Rahmen des Versuches < 20%		Ja	Versuch erfolgreich?	Ja	
Tier nach Versuchsende getötet?		Ja	Tötungsmethode	Terminale Sedierung + zervikale Dislokation	

Tabelle 4: DSC / TSP-1-K.O. / funktionelle Gefäßdichte im Implantat

TSP-1 -/-			
Versuchstier	Tag 10 fvd [mm ⁻¹]	Tag 12 fvd [mm ⁻¹]	Tag 14 fvd [mm ⁻¹]
WAL-2445	0	0,08	0,04
WAL-2514	0,01	0,04	0,32
WAL-2519	0	0,05	0,24
WAL-2555	0	0,08	0,37
WAL-2572	0	0	0,31
WAL-2573	1,46	2,50	3,82
WAL-2521	0,47	1,32	1,01
WAL-2541	0	0	0

Tabelle 5: DSC / Wildtyp / funktionelle Gefäßdichte im Implantat

WT			
Versuchstier	Tag 10 fvd [mm ⁻¹]	Tag 12 fvd [mm ⁻¹]	Tag 14 fvd [mm ⁻¹]
BRI-223	0,06	0,29	0,99
BRI-225	2,34	4,70	4,79
BRI-244	0	0	0,22
BRI-252	0,16	0,41	2,85
BRI-254	0,15	1,21	2,09
BRI-283	0,11	0,33	0,95
BRI-284	0,17	0,29	0,71
BRI-288	1,26	2,04	2,81

Tabelle 6: DSC / TSP-1-K.O. / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat

TSP-1 -/-						
Versuchstier	Tag 10 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 10 Gefäßäste / Implantatfläche	Tag 12 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 12 Gefäßäste / Implantatfläche	Tag 14 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 14 Gefäßäste / Implantatfläche
WAL-2445	0	0	3,66	9,75	0	1,22
WAL-2514	0	0,93	0	1,83	8,14	23,51
WAL-2519	0	0	2,31	6,92	6,40	18,14
WAL-2555	0	0	0	3,37	1,25	7,51
WAL-2572	0	0	0	0	3,95	12,64
WAL-2573	35,90	78,40	70,96	161,63	87,08	178,08
WAL-2521	6,58	20,48	30,19	79,15	28,12	65,61
WAL-2541	0	0	0	0	0	0

Tabelle 7: DSC / Wildtyp / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantat

WT						
Versuchstier	Tag 10 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 10 Gefäßäste / Implantatfläche	Tag 12 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 12 Gefäßäste / Implantatfläche	Tag 14 Gefäßverzweigungen / Implantatfläche	Tag 14 Gefäßäste / Implantatfläche
BRI-223	2,26	5,27	10,08	20,88	47,59	96,69
BRI-225	49,64	115,43	168,433694	326,96	228,28	483,74
BRI-244	0	0	0	0	3,44	10,31
BRI-252	0	4,92	6,69	17,56	114,43	260,70
BRI-254	2,08	8,32	18,06	43,48	79,62	177,97
BRI-283	0,66	3,32	4,51	17,30	21,03	55,58
BRI-284	3,87	15,49	9,64	27,00	12,49	41,04
BRI-288	41,36	100,21	52,93	121,66	53,16	134,66

Tabelle 8: DSC / TSP-1-K.O. / funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager

TSP-1 -/-			
Versuchstier	Tag 3 fvd [mm ⁻¹]	Tag 7 fvd [mm ⁻¹]	Tag 10 fvd [mm ⁻¹]
WAL-2445	6,21	6,33	7,12

WAL-2514	5,60	5,66	5,85
WAL-2519	4,25	6,31	7,63
WAL-2555	3,86	4,61	5,68
WAL-2572	3,42	5,00	5,98
WAL-2573	5,91	7,94	6,22
WAL-2521	6,30	7,31	7,85
WAL-2541	5,17	7,19	7,78

Tabelle 9: DSC / Wildtyp / funktionelle Gefäßdichte im Implantatlager

WT			
Versuchstier	Tag 3 fvd [mm ⁻¹]	Tag 7 fvd [mm ⁻¹]	Tag 10 fvd [mm ⁻¹]
BRI-223	7,86	8,78	9,36
BRI-225	4,36	9,81	12,48
BRI-244	3,26	4,80	8,59
BRI-252	5,22	6,94	8,76
BRI-254	8,06	11,94	9,67
BRI-283	2,99	3,45	4,31
BRI-284	5,80	4,16	3,80
BRI-288	3,56	4,34	6,33

Tabelle 10: DSC / TSP-1-K.O. / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager

TSP-1 -/-						
Versuchstier	Tag 3 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 3 Gefäßäste / n(ROI)	Tag 7 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 7 Gefäßäste / n(ROI)	Tag 10 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 10 Gefäßäste / n(ROI)
WAL-2445	18,75	34,25	18,38	34,25	25,13	47,38
WAL-2514	12,2	25,4	13,8	27,4	15	29,8
WAL-2519	7,75	16,25	21,25	41,5	28,75	54
WAL-2555	6,5	14,83	9,33	19,83	14,67	28,17
WAL-2572	6	12,9	13,8	26,9	18,9	37
WAL-2573	13	26,5	28,5	54,5	16,5	37
WAL-2521	15,33	31,17	21,33	42	24,67	48
WAL-2541	9,67	19,58	19,33	36,5	23,75	43,75

Tabelle 11: DSC / Wildtyp / Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager

WT						

Versuchstier	Tag 3 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 3 Gefäßäste / n(ROI)	Tag 7 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 7 Gefäßäste / n(ROI)	Tag 10 Gefäßverzweigungen / n(ROI)	Tag 10 Gefäßäste / n(ROI)
BRI-223	30,67	54,67	36,17	64,67	37,83	68,5
BRI-225	9,43	19,57	46,29	80,86	64,29	109,14
BRI-244	2,38	5,75	8,5	16,5	29,5	52,5
BRI-252	10,89	23	22,44	41,56	38,56	66,78
BRI-254	30,91	57,09	60,64	104,82	40,91	72,09
BRI-283	4,4	10,1	4,2	10,2	6,4	14,9
BRI-284	15,75	29,75	8	17,5	6,75	14,25
BRI-288	6,67	27,33	9,5	38	22,83	87,33

Tabelle 12: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 3

TSP-1 -/-	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 3	0	13	9	33	29
	Tag 3	4	4	41	84	28
	Tag 3	1	21	78	277	29
	Tag 3	0	0	31	91	28
	Tag 3	3	14	29	56	28
	Tag 3	0	0	39	37	28
	Tag 3	0	0	20	56	27
	Tag 3	0	2	8	48	26
	Tag 3	5	4	14	46	28
	Tag 3	2	6	66	61	28
	Tag 3	0	0	29	64	28
	Tag 3	2	5	27	88	31
	Tag 3	0	2	26	37	29
	Tag 3	0	5	32	142	28

	Tag 3	0	4	19	43	32
	Tag 3	1	20	79	202	26
	Tag 3	2	22	64	161	28
	Tag 3	2	28	54	218	27
	Tag 3	5	7	72	139	28
	Tag 3	2	7	86	103	28
	Tag 3	2	19	79	154	28
	Tag 3	0	7	72	50	28
	Tag 3	4	11	53	41	28
	Tag 3	3	7	71	183	28
	Tag 3	0	0	40	63	28
	Tag 3	0	0	37	57	28
	Tag 3	1	0	36	78	28
	Tag 3	0	1	47	75	29
	Tag 3	1	9	35	93	29
	Tag 3	0	1	22	45	28
	Tag 3	0	0	50	62	28
	Tag 3	0	1	38	53	28
	Tag 3	0	0	21	20	28
	Tag 3	0	0	51	52	28
	Tag 3	0	4	51	35	28
	Tag 3	0	0	67	63	28
	Tag 3	0	0	47	70	28
	Tag 3	0	0	55	57	27

Tabelle 13: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 7

TSP-1 +/-	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 7	3	13	33	69	28
	Tag 7	4	6	29	79	26
	Tag 7	3	15	30	86	30
	Tag 7	2	1	31	56	28
	Tag 7	1	1	26	36	28
	Tag 7	6	4	41	54	28
	Tag 7	0	5	17	45	28
	Tag 7	0	2	18	40	28
	Tag 7	0	1	33	54	28
	Tag 7	5	0	55	70	28

	Tag 7	0	0	18	42	29
	Tag 7	3	5	19	150	28
	Tag 7	0	3	15	41	31
	Tag 7	2	27	49	256	29
	Tag 7	3	22	107	150	30
	Tag 7	1	44	98	220	35
	Tag 7	0	7	55	141	31
	Tag 7	4	33	74	78	28
	Tag 7	10	5	34	170	28
	Tag 7	4	18	48	49	28
	Tag 7	1	0	40	60	28
	Tag 7	9	3	13	264	12
	Tag 7	0	4	44	81	29
	Tag 7	2	5	37	64	28
	Tag 7	8	1	66	64	28
	Tag 7	0	0	55	52	28
	Tag 7	4	1	39	65	28
	Tag 7	1	22	31	43	28
	Tag 7	0	6	30	46	29
	Tag 7	0	2	38	87	28
	Tag 7	2	1	18	47	28
	Tag 7	0	0	49	52	29
	Tag 7	0	3	25	58	29
	Tag 7	1	11	33	61	29
	Tag 7	0	2	30	80	28
	Tag 7	0	0	53	43	28

Tabelle 14: DSC / TSP-1-K.O. / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 10

TSP-1 +/-						
	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 10	3	7	32	81	28
	Tag 10	2	0	38	88	30
	Tag 10	3	11	41	85	48
	Tag 10	0	1	9	57	19
	Tag 10	0	0	9	39	19
	Tag 10	0	1	19	54	19
	Tag 10	0	0	11	44	19

	Tag 10	0	0	18	52	19
	Tag 10	0	0	21	77	19
	Tag 10	0	0	12	62	19
	Tag 10	0	0	15	42	33
	Tag 10	2	3	36	145	28
	Tag 10	0	0	19	44	31
	Tag 10	0	2	20	252	28
	Tag 10	0	0	7	140	29
	Tag 10	0	4	31	254	29
	Tag 10	0	0	27	144	28
	Tag 10	2	6	51	63	28
	Tag 10	2	6	42	46	28
	Tag 10	0	0	27	47	28
	Tag 10	0	2	17	132	30
	Tag 10	0	0	24	65	19
	Tag 10	6	0	61	40	19
	Tag 10	2	0	23	47	19
	Tag 10	0	2	20	76	19
	Tag 10	4	21	30	59	19
	Tag 10	0	0	25	51	19
	Tag 10	1	4	15	108	28
	Tag 10	2	2	11	64	28
	Tag 10	0	0	33	50	30
	Tag 10	2	0	30	71	31
	Tag 10	4	12	31	64	28
	Tag 10	0	0	40	60	28
	Tag 10	0	0	44	68	29

Tabelle 15: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 3

WT						
	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 3	1	7	16	36	28
	Tag 3	2	12	33	97	28
	Tag 3	1	6	108	130	28
	Tag 3	1	0	11	40	28
	Tag 3	1	1	71	139	28
	Tag 3	2	0	68	46	29
	Tag 3	16	33	31	39	28

	Tag 3	0	0	66	51	28
	Tag 3	4	22	35	127	29
	Tag 3	4	15	36	182	28
	Tag 3	7	13	41	138	29
	Tag 3	0	5	6	36	28
	Tag 3	1	0	32	44	29
	Tag 3	5	17	30	60	28
	Tag 3	1	1	59	95	28
	Tag 3	0	3	5	56	28
	Tag 3	5	8	11	59	28
	Tag 3	2	9	16	41	28
	Tag 3	3	0	85	86	28

Tabelle 16: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 7

WT						
	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 7	4	7	14	97	28
	Tag 7	2	5	11	131	28
	Tag 7	1	4	14	40	28
	Tag 7	1	3	23	118	28
	Tag 7	9	12	31	47	29
	Tag 7	0	2	34	39	28
	Tag 7	1	12	42	44	28
	Tag 7	0	2	31	150	28
	Tag 7	0	0	25	177	28
	Tag 7	1	2	74	187	29
	Tag 7	1	0	17	36	28
	Tag 7	1	6	22	131	28
	Tag 7	0	0	11	61	28
	Tag 7	4	9	5	62	28
	Tag 7	2	11	22	137	28
	Tag 7	1	0	17	108	28
	Tag 7	1	7	25	48	34
	Tag 7	0	5	22	64	28
	Tag 7	0	0	51	76	28

Tabelle 17: DSC / Wildtyp / Leukozyten-Endothelinteraktion an Versuchstag 10

WT						
	Beobachtungstag	Statische Leukozyten	Rollende Leukozyten	Leukozyten im Strom	Gefäßdiameter [μm]	Videolänge [s]
	Tag 10	0	2	8	40	28
	Tag 10	0	0	8	88	28
	Tag 10	0	0	32	26	29
	Tag 10	6	0	21	41	28
	Tag 10	0	0	40	26	29
	Tag 10	0	0	7	181	19
	Tag 10	0	0	30	228	28
	Tag 10	0	1	32	145	28
	Tag 10	0	1	14	33	28
	Tag 10	0	0	17	137	28
	Tag 10	0	0	13	46	28
	Tag 10	1	4	22	36	28
	Tag 10	0	4	12	97	28
	Tag 10	9	12	16	40	28
	Tag 10	2	1	36	71	30
	Tag 10	0	0	51	54	28

Tabelle 18: DSC / TSP-1-K.O. / Dynamische Desintegrationskraft

TSP-1 +/-		
Versuchstier	cN / mm ²	Videolänge [s]
WAL-2464	0,24	33
WAL-2501	0,33	83
WAL-2519	0,29	54

Tabelle 19: DSC / Versuchsgruppenanalyse

	WT	Histologische Fixierung	TSP-1 +/-	Histologische Fixierung
	BRI-223	Ja	WAL-2445	Ja
	BRI-225	Ja	WAL-2464	Ja
	BRI-227	Ja	WAL-2501	Ja
	BRI-229	Ja	WAL-2514	Ja
	BRI-230	Ja	WAL-2519	Ja
	BRI-242	Nein	WAL-2521	Ja

	BRI-243	Nein	WAL-2533	Ja
	BRI-244	Nein	WAL-2535	Nein
	BRI-245	Nein	WAL-2541	Nein
	BRI-246	Nein	WAL-2555	Ja
	BRI-247	Nein	WAL-2571	Ja
	BRI-248	Ja	WAL-2572	Ja
	BRI-249	Nein	WAL-2573	Ja
	BRI-252	Ja	WAL-2574	Ja
	BRI-253	Ja		
	BRI-254	Ja		
	BRI-273	Ja		
	BRI-279	Ja		
	BRI-283	Ja		
	BRI-284	Ja		
	BRI-288	Ja		
	BRI-289	Ja		
Anzahl	22		14	
Auswertbar	8		8	
Auswertbarkeit [%]	36%		57%	

CAM Assay:

Tabelle 20: CAM Assay / TSP-1 / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7

TSP-1 - Tag 7					
Ei	Gefäßlänge [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßverzweigungen	Gefäß- äste
T-51	5930	1004773	0,005902101	11	28
T-55	5682	1003974	0,005659294	15	34
T-59	6406	1002067	0,006392982	20	45
T-61	7866	1005692	0,007821028	30	63
T-62	9445	1002505	0,009421561	37	78
T-77	10190	1005209	0,010137189	40	78
T-79	8838	1002166	0,008818452	43	103
T-82	9322	1004876	0,009276925	35	77
T-86	8410	1006115	0,008359133	38	73
T-87	8739	1003167	0,008711075	33	74
T-89	12696	1003206	0,01265509	61	129
T-90	7921	1004682	0,007883849	28	62
T-63	17818	1005704	0,017716855	141	242
T-68	12849	1004820	0,012787733	88	155
T-1 (10.09.19)	7005	1005096	0,006969509	36	68
T-3 (10.09.19)	11040	1002214	0,01101555	59	115
T-15 (10.09.19)	12916	1003655	0,012868835	86	165
T-25 (10.09.19)	11476	1003426	0,011436754	51	101
T-26 (10.09.19)	9580	1002611	0,009554741	48	102
T-18 (30.07.19)	17968	1006568	0,017851041	153	271

Tabelle 21: CAM Assay / TSP-1 / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10

TSP-1 - Tag 10					
Ei	Gefäßlänge [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßverzweigungen	Gefäß- äste
T-51	11761	1002611	0,011730054	53	105
T-55	10548	1004820	0,010497273	48	93
T-59	11102	1002067	0,01107894	56	112
T-61	12417	1004497	0,012361614	59	124
T-62	16281	1002373	0,016242705	62	116

T-77	15681	1006326	0,015582396	70	137
T-79	12823	1005795	0,012749302	74	149
T-82	12478	1002792	0,012443193	71	145
T-86	10565	1003789	0,010525245	45	90
T-87	12908	1005209	0,012841176	94	179
T-89	14479	1004393	0,014415341	76	132
T-90	14576	1005636	0,014494101	99	185
T-63	15030	1003720	0,014974338	89	169
T-68	17085	1005209	0,016996008	107	211
T-1 (10.09.19)	10577	1003116	0,010544024	70	135
T-3 (10.09.19)	11193	1005636	0,011130096	51	112
T-15 (10.09.19)	12092	1003310	0,01205181	58	116
T-25 (10.09.19)	18423	1003426	0,018359898	119	214
T-26 (10.09.19)	15280	1002235	0,015245458	118	220
T-18 (30.07.19)	14362	1003543	0,014311258	122	222

Tabelle 22: CAM Assay / VEGF-A / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7

VEGF-A - Tag 7					
Ei	Gefäßlänge [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
V-95	9318	1004909	0,009272546	31	65
V-97	7635	1003375	0,007609175	36	73
V-107	11657	1004112	0,011608894	55	110
V-116	9368	1005843	0,00931367	41	75
V-122	10834	1005286	0,010777148	53	126
V-126	10885	1005498	0,010825464	52	102
V-9 (10.09.19)	14171	1003098	0,014127012	74	136
V-9 (30.07.19)	19060	1003823	0,018987493	120	223
V-15 (30.07.19)	19715	1001719	0,019681144	176	320
V-20 (30.07.19)	15300	1003772	0,015242617	95	157

Tabelle 23: CAM Assay / VEGF-A / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10

VEGF-A - Tag 10					

Ei	Gefäßlängen [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
V-95	16382	1004909	0,016302463	99	177
V-97	9347	1002235	0,009326091	29	58
V-107	16681	1004941	0,016599036	105	189
V-116	17284	1005079	0,017197086	108	198
V-122	14267	1004773	0,014199193	82	155
V-126	15962	1004345	0,015892737	77	150
V-9 (10.09.19)	19494	1005032	0,019396791	166	286
V-9 (30.07.19)	26780	1002662	0,026709215	280	481
V-15 (30.07.19)	28824	1005135	0,028676739	313	528
V-20 (30.07.19)	18501	1004786	0,018412598	139	244

Tabelle 24: CAM Assay / NaCl / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7

NaCl - Tag 7					
Ei	Gefäßlängen [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
N-17	11376	1003655	0,011334339	46	88
N-19	9888	1004134	0,00984693	33	73
N-26	9311	1003655	0,009276672	38	76
N-28	12584	1005895	0,012510275	73	160
N-38	10559	1005511	0,010500986	76	157
N-40	8217	1004773	0,008177671	28	57
N-41	12137	1003448	0,012095148	60	112
N-43	15810	1003012	0,015762794	116	218
N-44	11875	1002598	0,011844159	52	101
N-47	8314	1005187	0,00827107	45	93
N-2 (10.09.19)	17105	1005450	0,017011846	125	214
N-14 (10.09.19)	17582	1005795	0,017480725	100	192
N-20 (10.09.19)	14692	1003931	0,014634316	84	162

Tabelle 25: CAM Assay / NaCl / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10

NaCl - Tag 10					
Ei	Gefäßlängen [µm]	Fläche der ROI [µm ²]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
N-17	15058	1002235	0,015024249	86	156

N-19	10579	1004665	0,010530232	42	87
N-26	11222	1004773	0,011168849	53	112
N-28	13582	1005795	0,013504102	66	124
N-38	12135	1003655	0,012091085	88	152
N-40	12084	1004820	0,012025596	37	76
N-41	15570	1002205	0,015535775	105	198
N-43	16093	1005187	0,016009752	119	230
N-44	16241	1004807	0,016162954	87	168
N-47	13196	1004665	0,013134818	70	159
N-2 (10.09.19)	24111	1003012	0,02403863	234	404
N-14 (10.09.19)	23890	1004665	0,023779563	213	362
N-20 (10.09.19)	16975	1003655	0,016913541	125	211

Tabelle 26: CAM Assay / Kontrollgruppe / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 7

Kontrollgruppe - Tag 7					
Ei	Gefäßlängen [μm]	Fläche der ROI [μm^2]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
K-3 (16.09.19)	13721	1005912	0,013639905	68	128
K-4 (16.09.19)	11171	1004941	0,011116494	56	116
K-7 (16.09.19)	9861	1003892	0,009823131	47	99
K-11 (16.09.19)	9790	1004807	0,009743295	47	96
K-3 (16.07.19)	10934	1006244	0,010865794	55	121
K-4 (16.07.19)	10317	1005014	0,010265206	54	104
K-4 (30.07.19)	10843	1005286	0,010785544	39	83

Tabelle 27: CAM Assay / Kontrollgruppe / funktionelle Gefäßdichte, Gefäßverzweigungen und Gefäßäste im Implantatlager an Versuchstag 10

Kontrollgruppe Tag 10					
Ei	Gefäßlängen [μm]	Fläche der ROI [μm^2]	fvd	Gefäßver- zweigungen	Gefäß- äste
K-3 (16.09.19)	17590	1004682	0,01750833	120	210
K-4 (16.09.19)	12511	1006063	0,01243599	84	162
K-7 (16.09.19)	14140	1003892	0,014085044	91	161
K-11 (16.09.19)	12473	1005511	0,01240433	60	119
K-3 (16.07.19)	14308	1006220	0,014219685	43	93

K-4 (16.07.19)	11918	1005895	0,011847728	57	115
K-4 (30.07.19)	14985	1004393	0,014919096	79	148

Tabelle 28: CAM Assay / TSP-1 / Versuchsgruppenanalyse

TSP-1					
Lfd. Nr.	Ei-Nr. (Charge)	Auswertbarkeit	Grund des Ausfalls	Tag des Ausfalls	Histologische Fixierung
1	T-51 (16.09.19)	Ja			Ja
2	T-55 (16.09.19)	Ja			Ja
3	T-59 (16.09.19)	Ja			Ja
4	T-61 (16.09.19)	Ja			Ja
5	T-62 (16.09.19)	Ja			Ja
6	T-77 (16.09.19)	Ja			Ja
7	T-79 (16.09.19)	Ja			Ja
8	T-82 (16.09.19)	Ja			Ja
9	T-86 (16.09.19)	Ja			Ja
10	T-87 (16.09.19)	Ja			Ja
11	T-89 (16.09.19)	Ja			Ja
12	T-90 (16.09.19)	Ja			Ja
13	T-63 (16.09.19)	Ja			Ja
14	T-68 (16.09.19)	Ja			Ja
15	T-1 (10.09.19)	Ja			Ja
16	T-3 (10.09.19)	Ja			Ja
17	T-15 (10.09.19)	Ja			Ja
18	T-25 (10.09.19)	Ja			Ja
19	T-26 (10.09.19)	Ja			Ja
20	T-18 (30.07.19)	Ja			Ja
21	T-1 (30.07.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
22	T-2 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein

23	T-3 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
24	T-4 (30.07.19)	Nein	tot	2	Nein
25	T-5 (30.07.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
26	T-6 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
27	T-7 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
28	T-8 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
29	T-9 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
30	T-10 (30.07.19)	Nein	tot	6	Nein
31	T-11 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
32	T-12 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
33	T-13 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
34	T-14 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
35	T-15 (30.07.19)	Nein	tot	6	Nein
36	T-16 (30.07.19)	Nein	tot	6	Nein
37	T-17 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
38	T-19 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
39	T-52 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
40	T-53 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
41	T-54 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
42	T-56 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
43	T-57 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
44	T-58 (16.09.19)	Nein	tot	7	Nein
45	T-60 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
46	T-64 (16.09.19)	Nein	tot	10	Nein
47	T-65 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
48	T-66 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
49	T-67 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
50	T-69 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein

51	T-70 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
52	T-71 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
53	T-72 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
54	T-73 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
55	T-74 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
56	T-75 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
57	T-76 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
58	T-78 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
59	T-80 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
60	T-81 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
61	T-83 (16.09.19)	Nein	tot	7	Nein
62	T-84 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
63	T-85 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
64	T-88 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Nein
65	T-91 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
66	T-92 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
67	T-93 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
68	T-94 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
69	T-2 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
70	T-4 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
71	T-5 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
72	T-6 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
73	T-7 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
74	T-8 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
75	T-9 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
76	T-10 (10.09.19)	Nein	tot	4	Nein
77	T-11 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
78	T-12 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein

79	T-13 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
80	T-14 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Ja
81	T-16 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Ja
82	T-17 (10.09.19)	Nein	tot	2	Nein
83	T-18 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
84	T-19 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Ja
85	T-20 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
86	T-21 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
87	T-22 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
88	T-23 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
89	T-24 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
90	T-27 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
91	T-28 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
92	K-2 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
93	T-34 (K-4) (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
94	K-6 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	4	Nein
95	T-33 (K-7) (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja

Tabelle 29: CAM Assay / VEGF-A / Versuchsgruppenanalyse

VEGF					
Lfd. Nr.	Ei-Nr. (Charge)	Auswertbarkeit	Grund des Ausfalls	Tag des Ausfalls	Histologische Fixierung
1	V-95 (16.09.19)	Ja			Ja
2	V-97 (16.09.19)	Ja			Ja
3	V-107 (16.09.19)	Ja			Ja
4	V-116 (16.09.19)	Ja			Ja
5	V-122 (16.09.19)	Ja			Ja
6	V-126 (16.09.19)	Ja			Ja
7	V-9 (10.09.19)	Ja			Ja

8	V-9 (30.07.19)	Ja			Ja
9	V-15 (30.07.19)	Ja			Ja
10	V-20 (30.07.19)	Ja			Ja
11	V-96 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
12	V-98 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
13	V-99 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
14	V-100 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
15	V-101 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Ja
16	V-102 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
17	V-103 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
18	V-104 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
19	V-105 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
20	V-106 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
21	V-108 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
22	V-109 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
23	V-110 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
24	V-111 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
25	V-112 (16.09.19)	Nein	tot	7	Nein
26	V-113 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
27	V-114 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
28	V-115 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
29	V-117 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Nein
30	V-118 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Ja
31	V-119 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
32	V-120 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
33	V-121 (16.09.19)	Nein	tot	8	Nein
34	V-123 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
35	V-124 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein

36	V-125 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
37	V-127 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Ja
38	V-1 (10.09.19)	Nein	tot	5	Nein
39	V-2 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
40	V-3 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
41	V-4 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
42	V-5 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
43	V-6 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
44	V-7 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
45	V-8 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Ja
46	V-10 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
47	V-11 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
48	V-12 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Ja
49	V-13 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
50	V-14 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
51	V-15 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
52	V-16 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
53	V-17 (10.09.19)	Nein	tot	9	Nein
54	V-18 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
55	V-19 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
56	V-20 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
57	V-21 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
58	V-22 (10.09.19)	Nein	tot	2	Nein
59	V-23 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Nein
60	V-24 (10.09.19)	Nein	tot	5	Nein
61	V-25 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
62	V-26 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
63	V-27 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein

64	V-28 (10.09.19)	Nein	tot	5	Nein
65	V-29 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
66	V-30 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
67	V-1 (30.07.19)	Nein	tot	6	Nein
68	V-2 (30.07.19)	Nein	tot	3	Nein
69	V-3 (30.07.19)	Nein	tot	3	Nein
70	V-4 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
71	V-5 (30.07.19)	Nein	tot	8	Nein
72	V-6 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
73	V-7 (30.07.19)	Nein	tot	2	Nein
74	V-8 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
75	V-10 (30.07.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
76	V-11 (30.07.19)	Nein	tot	3	Nein
77	V-12 (30.07.19)	Nein	tot	2	Nein
78	V-13 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
79	V-14 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
80	V-16 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
81	V-17 (30.07.19)	Nein	tot	2	Nein
82	V-18 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
83	V-19 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein

Tabelle 30: CAM Assay / NaCl / Versuchsgruppenanalyse

NaCl					
Lfd. Nr.	Ei-Nr. (Charge)	Auswertbarkeit	Grund des Ausfalls	Tag des Ausfalls	Histologische Fixierung
1	N-17 (16.09.19)	Ja			Ja
2	N-19 (16.09.19)	Ja			Ja
3	N-26 (16.09.19)	Ja			Ja
4	N-28 (16.09.19)	Ja			Ja

5	N-38 (16.09.19)	Ja			Ja
6	N-40 (16.09.19)	Ja			Ja
7	N-41 (16.09.19)	Ja			Ja
8	N-43 (16.09.19)	Ja			Ja
9	N-44 (16.09.19)	Ja			Ja
10	N-47 (16.09.19)	Ja			Ja
11	N-2 (10.09.19)	Ja			Ja
12	N-14 (10.09.19)	Ja			Ja
13	N-20 (10.09.19)	Ja			Ja
14	N-15 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
15	N-16 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
16	N-18 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
17	N-20 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
18	N-21 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
19	N-22 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
20	N-23 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
21	N-24 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
22	N-25 (16.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
23	N-27 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	10	Nein
24	N-29 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
25	N-30 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
26	N-31 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
27	N-32 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
28	N-33 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
29	N-34 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
30	N-35 (16.09.19)	Nein	tot	10	Nein
31	N-36 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
32	N-37 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein

33	N-39 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
34	N-42 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
35	N-45 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
36	N-46 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
37	N-48 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
38	N-49 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
39	N-50 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Ja
40	N-1 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
41	N-3 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
42	N-4 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
43	N-5 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Nein
44	N-6 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
45	N-7 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
46	N-8 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	1	Nein
47	N-9 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
48	N-10 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
49	N-11 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
50	N-12 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
51	N-13 (10.09.19)	Nein	tot	6	Nein
52	N-15 (10.09.19)	Nein	tot	1	Nein
53	N-16 (10.09.19)	Nein	tot	2	Nein
54	N-17 (10.09.19)	Nein	tot	9	Nein
55	N-18 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
56	N-19 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
57	N-21 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
58	N-22 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
59	N-23 (10.09.19)	Nein	tot	2	Nein
60	N-24 (10.09.19)	Nein	tot	5	Nein

Tabelle 31: CAM Assay / Kontrollgruppe / Versuchsgruppenanalyse

K					
Lfd. Nr.	Ei-Nr. (Charge)	Auswertbarkeit	Grund des Ausfalls	Tag des Ausfalls	Histologische Fixierung
1	K-3 (16.09.19)	Ja			Ja
2	K-4 (16.09.19)	Ja			Ja
3	K-7 (16.09.19)	Ja			Ja
4	K-11 (16.09.19)	Ja			Ja
5	K-3 (16.07.19)	Ja			Ja
6	K-4 (16.07.19)	Ja			Ja
7	K-4 (30.07.19)	Ja			Ja
8	K-1 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
9	K-2 (16.09.19)	Nein	tot	7	Nein
10	K-5 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
11	K-6 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
12	K-8 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
13	K-9 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	4	Nein
14	K-10 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
15	K-12 (16.09.19)	Nein	PPE luxiert	4	Nein
16	K-13 (16.09.19)	Nein	tot	3	Nein
17	K-14 (16.09.19)	Nein	tot	8	Nein
18	K-1 (10.09.19)	Nein	tot	2	Nein
19	K-3 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
20	K-5 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
21	K-8 (10.09.19)	Nein	tot	7	Nein
22	K-9 (10.09.19)	Nein	tot	3	Nein
23	K-10 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
24	K-11 (10.09.19)	Nein	tot	10	Nein

25	K-12 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
26	K-13 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
27	K-14 (10.09.19)	Nein	fibrosiert	10	Ja
28	K-15 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
29	K-16 (10.09.19)	Nein	tot	10	Nein
30	K-17 (10.09.19)	Nein	tot	10	Nein
31	K-18 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
32	K-19 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
33	K-20 (10.09.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
34	K-1 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	10	Ja
35	K-2 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
36	K-3 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
37	K-5 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	8	Nein
38	K-6 (30.07.19)	Nein	tot	3	Nein
39	K-7 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
40	K-8 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	8	Nein
41	K-9 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
42	K-10 (30.07.19)	Nein	tot	1	Nein
43	K-11 (30.07.19)	Nein	tot	8	Nein
44	K-12 (30.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
45	K-1 (22.07.19)	Nein	tot	4	Nein
46	K-2 (22.07.19)	Nein	tot	3	Nein
47	K-3 (22.07.19)	Nein	tot	4	Nein
48	K-4 (22.07.19)	Nein	tot	1	Nein
49	K-5 (22.07.19)	Nein	tot	4	Nein
50	K-6 (22.07.19)	Nein	PPE luxiert	4	Nein
51	K-1 (16.07.19)	Nein	tot	2	Nein
52	K-2 (16.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein

53	K-5 (16.07.19)	Nein	tot	8	Nein
54	K-6 (16.07.19)	Nein	tot	1	Nein
55	K-7 (16.07.19)	Nein	PPE luxiert	3	Nein
56	K-8 (16.07.19)	Nein	PPE luxiert	7	Nein
57	K-9 (16.07.19)	Nein	PPE luxiert	10	Nein
58	K-10 (16.07.19)	Nein	tot	8	Nein

10.2 Anzeige vorveröffentlichter Ergebnisse

Gemäß §9, Absatz 4 der Promotionsordnung der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vom 23. Oktober 2017 wurde die Vorveröffentlichung von Ergebnissen aus der Dissertation angezeigt.

Die Tatsache, dass es sich um Ergebnisse aus der Dissertation handelt, wurde jeweils als Fußnote kenntlich gemacht und mein Name ist als Autor genannt.

1. Vortrag, 90. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., 30.05.-01.06.2019, Berlin.

Eckrich, J., Maas, A., Jurk, K., Strieth, S., Kumm, E. and Brieger, J., 2019. Die Rolle von Thrombospondin-1 bei Biomaterialintegration von Implantaten aus porösem Polyethylen in vivo. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 98(S 02), p.10999.

2. Vortrag, 93. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., 25.-28.05.2022, Hannover.

Maas, A.P., Jurk, K., Kumm, E., Strieth, S., Brieger, J. and Eckrich, J., 2022. Der Einfluss der Oberflächenmodifizierung mit Thrombospondin-1 auf die Biomaterialintegration von Implantaten aus porösem Polyethylen. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 101(S 02).

Es befindet sich zudem eine Publikation der Ergebnisse dieses Promotionsprojektes in Arbeit.

11 Danksagung

12 Tabellarischer Lebenslauf