

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)**

**ISOLIERTE MIKROVASKULÄRE FRAGMENTE AUS FETTGEWEBE ALS
VASKULARISIERUNGSEINHEITEN IM TISSUE ENGINEERING:
ETABLIERUNG NEUER STRATEGIEN ZUR VERBESSERUNG IHRER NUTZBARKEIT
UND IHRES VASKULARISIERUNGSPOTENTIALS**

Eine experimentelle *in vivo* Studie am Rückenhautkammermodell der Maus

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2019

vorgelegt von Philipp Karschnia
geboren am 20.02.1994 in Frankfurt am Main

Meiner Familie in Dankbarkeit

Datum der mündlichen Prüfung: 27.08.2019

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke, Ph.D

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	5
3.1. Tissue Engineering	5
3.2. Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten	9
4. ZIEL DER STUDIE	14
5. MATERIAL UND METHODIK	15
5.1. Versuchstiere	15
5.2. Isolierung und Behandlung mikrovaskulärer Fragmente	15
5.2.1. Isolierung mikrovaskulärer Fragmente	15
5.2.2. Kryokonservierung	17
5.2.3. Kultivierung in EPO- oder Vehikel-supplementiertem Medium	18
5.3. In vitro Analysen	18
5.3.1. Techniken zur Analyse mikrovaskulärer Fragmente	18
5.3.2. Strukturelle und morphologische Analysen	19
5.3.2.1. Anzahl	19
5.3.2.2. Längenverteilung	20
5.3.2.3. Zelluläre Zusammensetzung	20
5.3.3. Funktionelle Analysen	21
5.3.3.1. Viabilität	21
5.3.3.2. Proteinexpression	21
5.3.3.3. Sekretion von Wachstumsfaktoren	22
5.4. Prävaskularisierte Scaffolds	23
5.4.1. Prozessierung der Scaffolds	23

5.4.2. Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten	24
5.4.3. Oberflächenmorphologie	24
5.5. Modell der Rückenhautkammer	25
5.5.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer	25
5.5.2. Präparation der Rückenhautkammer	27
5.5.3. Implantation prävaskularisierter Scaffolds	29
5.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	30
5.6.1. Mikrozirkulatorische Analysen	32
5.6.1.1. <i>Perfundierte ROIs</i>	33
5.6.1.2. <i>Funktionelle Kapillardichte</i>	33
5.6.1.3. <i>Gefäßdurchmesser</i>	33
5.6.1.4. <i>Blutzellgeschwindigkeit</i>	34
5.6.1.5. <i>Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss</i>	35
5.6.1.6. <i>Scherrate</i>	36
5.6.2. Abschluss der <i>in vivo</i> Untersuchungen	36
5.7. Histologie und Immunhistochemie	37
5.7.1. Histologische Präparate	37
5.7.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	37
5.7.3. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung	38
5.7.4. CD31-Caspase (Casp)-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung ...	39
5.8. Experimentelles Protokoll	40
5.8.1. <i>In vitro</i> Versuchsgruppen	40
5.8.2. <i>In vivo</i> Versuchsgruppen	41
5.8.3. Versuchsablauf	41
5.9. Statistik	42
6. ERGEBNISSE	43
6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	43
6.2. Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente	44
6.2.1. <i>In vitro</i> Analysen	44
6.2.1.1. <i>Anzahl und Längenverteilung</i>	44
6.2.1.2. <i>Zelluläre Zusammensetzung</i>	46
6.2.1.3. <i>Viabilität</i>	46

6.2.1.4. <i>Proteinexpression</i>	47
6.2.1.5. <i>Sekretion von Wachstumsfaktoren</i>	49
6.2.1.6. <i>Morphologie</i>	49
6.2.2. <i>In vivo</i> Analysen	51
6.2.2.1. <i>Vaskularisierung der implantierten Scaffolds</i>	51
6.2.2.2. <i>Mikrohämodynamik</i>	53
6.2.2.3. <i>Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds</i>	54
6.3. EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente	57
6.3.1. <i>In vitro</i> Analysen	57
6.3.1.1. <i>Proteinexpression</i>	57
6.3.1.2. <i>Viabilität und Proliferation</i>	59
6.3.2. <i>In vivo</i> Analysen	60
6.3.2.1. <i>Vaskularisierung der implantierten Scaffolds</i>	60
6.3.2.2. <i>Mikrohämodynamik</i>	61
6.3.2.3. <i>Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds</i>	63
6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	65
7. DISKUSSION	67
7.1. Diskussion von Material und Methoden	67
7.1.1. Modell der Rückenhautkammer	67
7.1.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	69
7.2. Diskussion der Ergebnisse	70
7.2.1. Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente	70
7.2.1.1. <i>Klinische Perspektiven</i>	74
7.2.2. EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente	74
7.2.2.1. <i>Klinische Perspektiven</i>	78
8. LITERATURVERZEICHNIS	80
9. DANKSAGUNG	100
10. LEBENS LAUF	101

11. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	103
11.1. Originalarbeiten aus der vorliegenden Dissertation	103
11.2. Weitere Originalarbeiten	103
11.3. Übersichtsarbeiten	104
11.4. Zitierfähige Abstracts und Kongressbeiträge	105
11.5. Cover page	107

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel des Tissue Engineerings ist die Herstellung von autologem Ersatzgewebe. Hierzu werden Zellen auf Trägermatrizes, die man als Scaffolds bezeichnet, gesiedelt. Die so entstandenen Gewebekonstrukte können anschließend in einen Gewebedefekt implantiert werden. Für den klinischen Erfolg dieser Methode ist die rasche Vaskularisierung der Implantate entscheidend. Dieser Prozess kann durch die Prävaskularisierung von Scaffolds mit adipösen mikrovaskulären Fragmenten, die sich über Inoskulation mit den Gefäßen des umliegenden Empfängergewebes verbinden, erheblich beschleunigt und verbessert werden.

Die Ergebnisse vorangehender Studien weisen auf eine deutlich eingeschränkte Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten aus alten Spendern hin. Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde daher zur möglichen Lösung dieses Problems erstmalig das Biobanking von mikrovaskulären Fragmenten junger Spender etabliert. Hierzu wurden mikrovaskuläre Fragmente aus den epididymalen Fettpolstern von C57BL/6 Spendermäusen isoliert, bei -196 °C für 7 Tage kryokonserviert und morphologisch sowie funktionell mit frisch isolierten Fragmenten verglichen. Zusätzlich wurden zur Analyse der *in vivo* Vaskularisierungskapazität kryokonservierte sowie frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente aus transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Os/J Spendermäusen auf Integra[®]-Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammern von Green Fluorescent Protein (GFP)-negativen C57BL/6 Wildtyp-Empfängermäusen implantiert. Die Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke wurde mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie über 14 Tage untersucht.

Rasterelektronenmikroskopische und durchflusszytometrische Analysen zeigten eine unveränderte Morphologie und zelluläre Zusammensetzung der kryokonservierten Fragmente, während ihre Anzahl und Viabilität im Vergleich zu frisch isolierten Kontrollen reduziert war. Die Kryokonservierung steigerte weiterhin die Expression pro-angiogener Proteine innerhalb der Fragmente, so dass sie auch mehr Wachstumsfaktoren sezernierten. Entsprechend verbanden sich sowohl die kryokonservierten als auch die frisch isolierten mikrovaskulären Fragmente innerhalb

der implantierten Integra®-Scaffolds rasch zu durchbluteten Gefäßnetzwerken, welche sich in ihrer Dichte und mikrohämodynamischen Parametern nicht unterschieden. Dabei konnte die gesteigerte angiogene Aktivität der kryokonservierten Fragmente immunhistochemisch anhand eines größeren Anteils GFP-positiver Gefäße innerhalb der Netzwerke gezeigt werden. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Kryokonservierung einen vielversprechenden Ansatz zur Langzeitlagerung mikrovaskulärer Fragmente darstellt.

Die Ausbildung eines Gefäßnetzwerks durch mikrovaskuläre Fragmente benötigt trotz der ausgezeichneten regenerativen Eigenschaften dieser Vaskularisierungseinheiten mehrere Tage. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dieser Prozess durch Erythropoietin (EPO) weiter verbessert und beschleunigt werden kann. Hierzu wurden GFP-positive mikrovaskuläre Fragmente für 24 h in Medium kultiviert, welches mit EPO oder Vehikel supplementiert wurde. Anschließend erfolgte der Transfer der mikrovaskulären Fragmente auf Integra®-Scaffolds, welche in die Rückenhautkammern von GFP-negativen C57BL/6 Wildtyp-Empfängermäusen implantiert wurden. Mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie histologischen und immunhistochemischen Analysen wurde die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke über 14 Tage untersucht.

EPO verbesserte die Viabilität und Proliferation der Fragmente und induzierte die Expression pro-angiogener Proteine. Entsprechend bildeten sich in den Scaffolds mikrovaskuläre Netzwerke deutlich schneller und dichter aus als in der Kontrollgruppe. Die beschleunigte Netzbildung ging mit einer verbesserten Reifung der Gefäße und einer vermehrten Anzahl von GFP-positiven sowie -negativen Gefäßen im Randbereich um die Implantate einher. Somit kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass EPO die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente steigert.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit neue Ansätze auf, durch die der Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten als Vaskularisierungseinheiten weiter verbessert werden kann. Diese Ansätze können zukünftig wesentlich zum klinischen Erfolg neuer Prävasikularisierungsstrategien im Tissue Engineering beitragen.

2. SUMMARY

Tissue engineering aims on the generation of autologous tissue substitutes. For this purpose, cells are seeded onto carrier matrices, also referred to as scaffolds. The resulting tissue constructs can be implanted into a tissue defect. The rapid vascularization of the implants is crucial for the clinical success of this approach. This can be achieved by the prevascularization of scaffolds with microvascular fragments. These microvascular fragments reassemble into new microvascular networks and develop interconnections to the host microvasculature.

Recent studies indicate a reduced vascularization capacity of microvascular fragments from aged donors. To overcome this problem, biobanking of microvascular fragments from young donors has been established in the first part of the present thesis. Microvascular fragments were isolated from epididymal fat pads of C57BL/6 donor mice, cryopreserved at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days and subsequently compared with freshly isolated microvascular fragments. Moreover, cryopreserved and freshly isolated microvascular fragments from C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J donor mice were seeded on Integra[®] scaffolds, which were implanted into dorsal skinfold chambers of green fluorescent protein (GFP)-negative recipient animals. The formation of vascular networks within the implants was analyzed by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry throughout an observation period of 14 days.

Scanning electron microscopy and flow cytometry revealed that cryopreservation did not affect the morphology and cellular composition of microvascular fragments, whereas their viability and number were significantly reduced when compared to freshly isolated controls. In addition, cryopreservation elevated the expression level of pro-angiogenic proteins within the microvascular fragments, which resulted in an increased release of growth factors. Accordingly, cryopreserved and control microvascular fragments induced a comparable vascularization of Integra[®] scaffolds without differences in microvascular network density, maturation, and remodeling. The enhanced angiogenic activity of cryopreserved microvascular fragments even resulted in a higher fraction of GFP-

positive microvessels within the implants. These findings indicate that cryopreservation represents a promising concept for the long-term storage of microvascular fragments.

Despite the excellent regenerative potential of microvascular fragments, their reassembly into blood-perfused vascular networks still requires several days. The second part of the present thesis analyzed whether this process may be further improved by erythropoietin (EPO). For this purpose, GFP-positive microvascular fragments were cultivated for 24 h in medium supplemented with EPO or vehicle. Subsequently, the microvascular fragments were seeded onto Integra® scaffolds, which were implanted into dorsal skinfold chambers of GFP-negative C57BL/6 recipient mice. The vascularization of the implants was studied by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry throughout an observation period of 14 days.

EPO increased the viability and proliferation of microvascular fragments and up-regulated their expression of pro-angiogenic proteins. Accordingly, the *in vivo* formation of vascular networks within implanted scaffolds seeded with EPO-treated microvascular fragments was improved, as indicated by a higher functional microvessel density when compared to controls. This enhanced vascularization was associated with an accelerated microvascular maturation. Moreover, an increased number of GFP-positive and -negative microvessels was detected within the tissue surrounding the scaffolds seeded with EPO-treated microvascular fragments. These findings indicate that EPO further boosts the vascularization capacity of microvascular fragments.

Taken together, the present thesis demonstrates new approaches for an improved application of microvascular fragments as vascularization units. In the future, these approaches may markedly contribute to the clinical success of novel prevascularization strategies in tissue engineering.

3. EINLEITUNG

Der Funktionsersatz einer Zelle, eines Gewebes oder eines kompletten Organs des menschlichen Körpers zählt zu den anspruchsvollsten Herausforderungen der modernen Medizin. Zwar steigert die heutige Organ- und Transplantatversorgung sowohl die Lebensqualität als auch -erwartung betroffener Patienten, jedoch ist die Verfügbarkeit passender Spenderorgane limitiert. Darüber hinaus birgt jede allogene Gewebetransplantation das Risiko einer Abstoßungsreaktion durch den Empfängerorganismus. Vor allem unter immunologischen Gesichtspunkten eignet sich daher der Einsatz von autolog gewonnenem Spendermaterial optimal zur Rekonstruktion von Gewebedefekten. Diesen Ansatz verfolgt der Forschungszweig des Tissue Engineerings.

3.1. Tissue Engineering

Das Tissue Engineering beschäftigt sich als interdisziplinäres Forschungsgebiet an der Schnittstelle von Lebens- und Ingenieurwissenschaften mit der Herstellung von autologem Ersatzgewebe zur Reparatur von Gewebe- und Organdefekten [LANGER & VACANTI, 1993]. Der klassische Ansatz des Tissue Engineerings umfasst die Isolierung von Zellen eines Patienten, ihre Vermehrung in Kultur und deren anschließende Übertragung auf eine dreidimensionale Trägermatrix. Diese Matrix wird auch als Scaffold bezeichnet und bildet mit den besiedelten Zellen ein sogenanntes Gewebekonstrukt. Dieses Gewebekonstrukt steht schließlich zur Implantation in einen Gewebedefekt des Patienten zur Verfügung [CHANG & LEONG, 2008].

Scaffolds sollen den kultivierten Zellen aufgrund ihrer Struktur eine ideale Matrix bieten, auf der sie adhäreren, proliferieren und ihre physiologischen Funktionen erfüllen können [MURPHY et al., 2010]. Zu diesem Zweck kann auf verschiedene Biomaterialien zurückgegriffen werden, die sich in ihrer Struktur, Plastizität, Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit unterscheiden [CHAN & LEONG,

2008; O'BRIEN, 2011]. Dabei finden auf der einen Seite natürliche Materialien wie zum Beispiel Kollagen [FREYMAN et al., 2001], Alginat [MARIJNISSEN et al., 2002] oder dezellularisiertes Gewebe [GONG et al., 2011] Anwendung als Scaffolds. Auf der anderen Seite stehen artifizielle Materialien, darunter beispielsweise Keramiken [DUCHEYNE & QIU, 1999], synthetische Polymere wie Hydrogel [RISBUD et al., 2001] oder Metalle [SIKAVITSAS et al., 2003] zur Verfügung. Darüber hinaus werden zur Kombination der Eigenschaften von unterschiedlichen Biomaterialien auch Materialverbindungen eingesetzt. Ein solches Beispiel ist die Mischung von Kollagen und Glykosaminoglykan, die in Form der kommerziell erhältlichen Matrix Integra® zur Deckung von Hautdefekten klinisch genutzt wird. Integra® wurde bereits auch in zahlreichen tierexperimentellen Studien als Scaffold zur Erprobung neuer Tissue Engineering-Strategien verwendet [FRUEH et al., 2017; SPÄTER et al., 2017].

Um nach *in vivo* Implantation die Versorgung eines Gewebekonstruktes mit Sauerstoff und Nährstoffen per Diffusion zu gewährleisten, darf der maximale Abstand zwischen den zu versorgenden Zellen und einem Blutgefäß 200 µm nicht überschreiten [CARMELIET & JAIN, 2000]. Dünne Gewebe mit geringen metabolischen Anforderungen können entsprechend durch Diffusion ernährt werden. Dazu gehören hauptsächlich Haut und Knorpel, die für den klinischen Gebrauch bereits gezüchtet werden [KIM et al., 1994; KREMER et al., 2000]. Weiterhin konnte in ersten Versuchen auch künstlich erzeugtes Ersatzgewebe für vaginale Rekonstruktionen in Patienten mit Vaginalaplasie eingesetzt werden [JANSSEN et al., 2006; RAYA-RIVERA et al., 2014]. Allerdings ist der klinische Einsatz von Tissue Engineering-Verfahren außerhalb der genannten Beispiele noch nicht Standard geworden. Eine rasche Durchblutung kann bisher nämlich noch für kaum ein implantiertes Gewebekonstrukt gewährleistet werden, da das Gefäßwachstum aus dem umgebenden Gewebe nur langsam stattfindet. Die Vaskularisierung ist jedoch wesentlich für das Überleben und den langfristigen Funktionserhalt von dreidimensionalen Implantaten, die nicht ausreichend *per diffusionem* ernährt werden können. In diesen Fällen gehen die Zellen im Inneren der Gewebekonstrukte aufgrund von Hypoxie *in vivo* rasch zugrunde [LASCHKE et al., 2006].

In den letzten Jahren wurden deshalb im Tissue Engineering zwei grundsätzliche Konzepte zur Verbesserung der Durchblutung von Scaffolds verfolgt.

Das klassische angiogene Konzept fokussiert auf die Stimulation des vom Empfängerorganismus ausgehenden Gefäßwachstums [LASCHKE & MENGER, 2012; UTZINGER et al., 2015]. Dies kann bereits durch die Wahl des richtigen Biomaterials für ein Scaffold verbessert werden. Beispielsweise konnten RÜCKER et al. [2006] in einem Mausmodell zeigen, dass unter identischen Bedingungen das Einwachsen von Blutgefäßen in Polylactid-co-Glycolid- gegenüber Hydrogel-Scaffolds gesteigert war. Zusätzlich können auch Veränderungen der Scaffoldstruktur die Vaskularisierung steigern [GAFNI et al., 2006]. DRUECKE et al. [2004] verglichen beispielsweise die Vaskularisierung von Polyethylen-Scaffolds, die unterschiedliche Porengrößen von 20-300 µm aufwiesen. Dabei war ein großer Porendurchmesser mit einem signifikant gesteigerten Einwachsen von neuen Blutgefäßen in das Biomaterial verbunden. Daneben können Scaffolds durch lokal aufgebraachte Wachstumsfaktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) modifiziert werden. Die Scaffolds geben diese Faktoren nach ihrer Implantation konstant ab und stimulieren auf diese Weise das Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem umliegenden Empfängergewebe [EHRBAR et al., 2004; KAIGLER et al., 2006; GUAN et al., 2007]. Zusätzlich können durch die lokale Applikation von Zytokinen gezielt bestimmte Zellen des Empfängergewebes, wie beispielsweise mesenchymale Stammzellen, stimuliert werden. Stammzellen sind ebenfalls für die Bildung neuer Blutgefäße wichtig und werden durch Faktoren wie Stromal Cell-Derived Factor (SDF)-1 chemotaktisch aktiviert. Entsprechend zeigten SCHANTZ et al. [2007], dass die lokale Applikation von SDF-1 in einem Rattenmodell zu einer Verbesserung der Durchblutung von Scaffolds für das Tissue Engineering von Knochen führt. Allerdings ist durch die genannten Ansätze nur eine moderate Beschleunigung der Durchblutung von implantierten Scaffolds möglich. Der initiale avaskuläre Zeitraum nach Implantation ist für Gewebekonstrukte deshalb aufgrund eines fehlenden Gefäßnetzwerks immer noch mit einem dramatischen Gewebeverlust verbunden [LASCHKE & MENGER, 2016].

Eine vielversprechende Möglichkeit zur Lösung dieses Problems stellt das Konzept der Prävaskularisierung dar. Bei diesem Konzept werden präformierte Gefäße innerhalb von Scaffolds vor Implantation gezüchtet. Nach der Implantation der Scaffolds wachsen diese Gefäße und die Gefäße des Empfängergewebes aufeinander zu, um sich zu verbinden und so zu einer raschen Perfusion der

Gewebekonstrukte zu führen. Dieser Vorgang wird auch als Inokulation bezeichnet [LASCHKE et al., 2009]. Um prävascularisierte Netzwerke herzustellen, wurden bereits unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Methoden erprobt.

Zur *in vitro* Prävascularisierung werden Scaffolds in Kultur mit Einzelzellen besiedelt. Diese Zellen sind durch die Fähigkeit charakterisiert, sich zu funktionsfähigen Mikrogefäßen zusammenlagern zu können. Entsprechend wird hierzu hauptsächlich auf Endothelzellen oder entsprechende Vorläuferzellen zurückgegriffen [SCHECHNER et al., 2000; DUTTENHOEFER et al., 2013]. Zusätzlich können gewebespezifische Zellen mit den Endothelzellen ko-kultiviert werden. So kann ein Gewebekonstrukt hergestellt werden, das bereits zum Zeitpunkt der *in vivo* Implantation sowohl Zellen des zu ersetzenden Parenchyms als auch präformierte Gefäße enthält [ROUWKEMA et al., 2006; SEKIYA et al., 2013]. Als Alternative zu dieser *in vitro* Methode kann auch der lebende Organismus als natürlicher Bioreaktor zur Gefäßneubildung dienen. Bei den sogenannten *in situ* Techniken wird ein Scaffold in ein gut durchblutetes Primärgewebe implantiert, in welchem dann das Einwachsen neuer Blutgefäße aus dem Empfängergewebe erfolgt. Dabei kann die Vaskularisierung des Scaffolds durch Anlegen einer arteriovenösen Schleife weiter gefördert werden. Hierzu wird im Bereich des Scaffolds eine Anastomose zwischen einer Arterie und einer Vene geschaffen. Durch die Scherkräfte im Bereich dieser arteriovenösen Schleife sprießen neue Gefäße in die Umgebung aus [REN et al., 2008]. Wenn sich schließlich innerhalb des Scaffolds ein dichtes Gefäßnetzwerk gebildet hat, wird das so prävascularisierte Scaffold explantiert und sekundär in den eigentlichen Gewebedefekt transferiert [LASCHKE et al., 2008; KOKEMUELLER et al., 2010].

Die hier beschriebenen Ansätze schließen teils zeitaufwendige und komplexe Zellkulturtechniken sowie mehrfache chirurgische Eingriffe ein. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren eine neue Strategie zur Prävascularisierung etabliert, die grundlegende Prinzipien von *in vitro* und *in situ* Methoden kombiniert. Hierbei kommen adipöse mikrovaskuläre Fragmente zur Anwendung.

3.2. Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten

Mikrovaskuläre Fragmente sind vielversprechende natürliche Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering [LASCHKE & MENGER, 2015]. Sie können in großer Anzahl enzymatisch aus Fettgewebe isoliert werden, welches einfach mittels Liposuktion gewonnen werden kann. Mikrovaskuläre Fragmente sind eine Mischung aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit typischer Gefäßmorphologie [HOYING et al., 1996]. Darüber hinaus enthalten sie viele mesenchymale Stammzellen [McDANIEL et al., 2014]. Dementsprechend weisen mikrovaskuläre Fragmente ein einzigartiges regeneratives Potential auf und lagern sich nach Besiedlung auf Scaffolds und *in vivo* Implantation rasch zu einem neuen funktionellen Gefäßnetzwerk zusammen [SHEPHERD et al., 2004]. Durch den Anschluss dieses Netzwerks an die umliegenden Empfängergefäße und *vice versa* wird eine schnelle Blutperfusion erzielt (Abbildung 1).

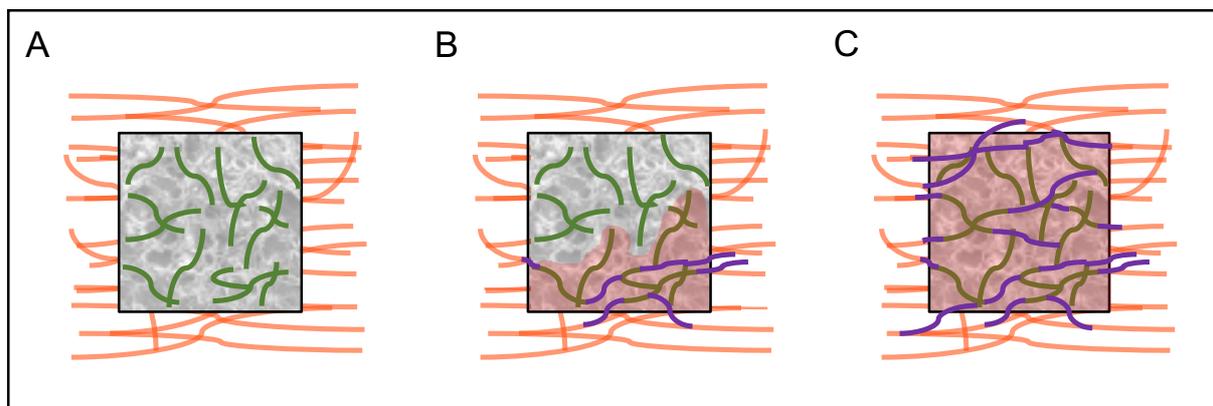


Abbildung 1: Prinzip der Prävascularisierung mit mikrovaskulären Fragmenten. **A:** Mikrovaskuläre Fragmente (grün) werden auf ein Scaffold gesiedelt, welches anschließend in ein vaskularisiertes Empfängergerüst (rot) implantiert wird. **B:** Die mikrovaskulären Fragmente und die Gefäße des Empfängergerüsts bilden erste Verbindungen (lila). Dieser Prozess führt zu einer teilweisen Durchblutung des Implantats (rötlich hinterlegt). **C:** Es bilden sich zahlreiche Verbindungen der mikrovaskulären Fragmente untereinander sowie mit den Gefäßen des Empfängergerüsts. Auf diese Weise entsteht ein vollständiges mikrovaskuläres Netzwerk, das schließlich im gesamten Implantat eine ausreichende Durchblutung gewährleistet.

Das Potential mikrovaskulärer Fragmente als Vaskularisierungseinheiten wurde bereits in verschiedenen Geweben untersucht. So erzielten NAKANO et al. [1998] durch Injektion mikrovaskulärer Fragmente in transplantierte Hautlappen eine Verbesserung der dermalen Mikrozirkulation. Der Einsatz von mikrovaskulären

Fragmenten ist jedoch nicht nur auf die Haut beschränkt [FRUEH et al., 2017]. Mikrovaskuläre Fragmente bilden nach ihrer Transplantation in oberflächliche Myokardschichten auch Anastomosen mit den Gefäßen des umgebenden Herzgewebes aus [NAKANO et al., 1999]. Entsprechend zeigten SHEPHERD et al. [2007], dass mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelte Patches die myokardiale Infarktgröße nach Ligatur einer Koronararterie verkleinern und die Pumpfunktion des Herzens verbessern können. Mit Hilfe von mikrovaskulären Fragmenten konnte außerdem tierexperimentell eine verbesserte Durchblutung von transplantierten Langerhans'schen Inseln [HISCOX et al., 2008] und von großen Muskeldefekten [PILIA et al., 2014] erreicht werden.

LASCHKE et al. [2012] zeigten erstmals, dass Polyurethan-Scaffolds für das Tissue Engineering von Knochen, die mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, eine deutlich verbesserte Vaskularisierung aufweisen als unbesiedelte Kontrollen. Innerhalb der Implantate entwickelte sich dabei ein Gefäßnetzwerk, welches während des Untersuchungszeitraums zunehmend ausreifte. Dabei nahm typischerweise der Durchmesser individueller Gefäße ab, während ihre Fließgeschwindigkeit zunahm. Die mikrovaskulären Fragmente sprossen außerdem in das umliegende Empfängergewebe aus und anastomosierten mit den dortigen Gefäßen. Dieser Prozess, der als externe Inoskulation bezeichnet wird, trug maßgeblich zur Durchblutung der Scaffolds bei [LASCHKE et al., 2012].

Der demographische Gesellschaftswandel hin zu einer erhöhten Lebenserwartung lässt erwarten, dass die Anzahl älterer Patienten in den kommenden Jahren ansteigen wird [CHOUDHERY et al., 2014]. Dabei kann spekuliert werden, dass mikrovaskuläre Fragmente in älteren Patienten zukünftig nur eingeschränkt für das Tissue Engineering verwendbar sein könnten. So wurde bereits gezeigt, dass mikrovaskuläre Fragmente, welche experimentell aus dem Fettgewebe gealterter Spendertiere isoliert wurden, eine signifikant verschlechterte Vaskularisierungskapazität im Vergleich zu Fragmenten aus adulten Kontrollspendern aufweisen [LASCHKE et al., 2014]. Um auch bei älteren Patienten mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten in der Zukunft anwenden zu können, ist deren Kryokonservierung ein möglicher Lösungsansatz.

Kryokonservierung bezeichnet die Nutzung sehr niedriger Temperaturen, um strukturell intakte Zellen und Organismen über einen langen Zeitraum aufzubewahren [PEGG, 2007]. Unkontrolliertes Einfrieren hat in der Regel letale Konsequenzen, die durch mechanische Schäden sich bildender Eiskristalle oder durch die sekundäre Wirkung der veränderten Elektrolytkonzentrationen auf die Zellwände hervorgerufen werden [LOVELOCK, 1953]. Um diese negativen Einflüsse auf die Zellen so gering als möglich zu halten, sollten verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Auf der einen Seite ist die Temperatur, der das einzufrierende Material ausgesetzt wird, ein kritischer Faktor. Besonders beim Einfriervorgang ist eine kontrollierte Kühlrate wichtig, um den Transport von Wasser über die Zellmembranen und damit die Wahrscheinlichkeit intrazellulärer Kristallbildung zu verringern [MAZUR, 1963]. Auf der anderen Seite kann durch das Hinzufügen kryoprotektiver Substanzen das Entstehen der Wasserkristalle verhindert werden [FULLER, 2004]. Durch die optimale Einstellung der genannten Einflussfaktoren ist die Kryokonservierung zahlreicher Zellen und Gewebe und deren anschließender Einsatz *in vivo* möglich. So konnten beispielsweise Spermatozoen [COHEN et al., 1997], hämatopoetische Stammzellen [M-REBOREDO et al., 2000], Langerhans'sche Inseln [MIRANDA et al., 2013] und auch große Gefäße [BROWN et al., 2009] erfolgreich kryokonserviert werden.

Für die zukünftige Anwendung ist es denkbar, mikrovaskuläre Fragmente aus dem Fettgewebe junger Patienten zu isolieren und zu kryokonservieren. Sollten diese mikrovaskulären Fragmente in einem späteren Lebensabschnitt benötigt werden, könnten sie aufgetaut und auf ein Scaffold gesiedelt werden. Das so prävascularisierte Scaffold würde dann für eine Implantation in einen Gewebedefekt zur Verfügung stehen. Ein ähnliches Konzept wurde für Stammzellen bereits beschrieben [CHOUDHERY & HARRIS, 2014]. **Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte daher die Hypothese geprüft werden, dass eine Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten möglich ist, ohne dabei ihr Vaskularisierungspotential zu beeinflussen.**

Die rasche Vaskularisierung eines Gewebekonstrukts ist entscheidend für dessen Langzeitüberleben *in vivo*. Die Verbindung mikrovaskulärer Fragmente zu einem neuen funktionellen Netzwerk benötigt allerdings trotz ihrer guten

Vaskularisierungskapazität einige Tage [LASCHKE et al., 2012]. Dieser Prozess könnte durch die Stimulation mit einem pro-angiogenen Faktor verbessert werden. Das Zytokin Erythropoietin (EPO) stellt für diesen Ansatz einen vielversprechenden Kandidaten dar.

Es existieren verschiedene, künstlich glykosylierte Formen des endogenen Hormons EPO: Epoetin alpha, Epoetin beta, Epoetin zeta, Epoetin theta und darüber hinaus das langwirksame Darbepoetin alpha. In Europa befindet sich hauptsächlich Epoetin beta (NeoRecormon®) in der klinischen Anwendung [HAYAT et al., 2008]. Der Wirkstoff wurde unter anderem zur Behandlung von Anämien oder zur Neuroprotektion frühgeborener Kinder zugelassen [RAINVILLE et al., 2016; FISCHER et al., 2017]. Die unterschiedlichen Formen von EPO teilen sich bis auf Darbepoetin alpha eine gemeinsame Aminosäuresequenz mit dem endogenen EPO [JELKMANN, 2013]. Dadurch aktivieren die künstlichen Formen dieselben Signalkaskaden wie das endogen produzierte Hormon, allen voran den Erythropoietin-Rezeptor EpoR und den nachfolgenden JAK2/STAT5-Signalweg [WITTHUHN et al., 1993; AAPRO et al., 2012]. Auf diese Weise stimuliert EPO die Proliferation und Differenzierung von erythrozytären Vorläuferzellen und hebt so den Hämatokrit-Wert des Blutes an [KIMÁKOVÁ et al., 2017]. Daneben weist EPO auch pro-angiogene Eigenschaften auf. Die pro-angiogene Wirkung konnte bereits *in vitro* an humanen Endothelzelllinien [MCVICAR et al., 2010] als auch *in vivo* [KERTESZ et al., 2004; LAMANUZZI et al., 2016] gezeigt werden. So beobachteten McVICAR et al. [2010], dass humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen nach 24-stündiger EPO-Behandlung schneller endotheliale Sprossen bilden als unbehandelte Kontrollen. Darüber hinaus konnte der pro-angiogene Einfluss von EPO sowohl während der physiologischen Geweberegeneration [SORG et al., 2009] als auch unter pathologischen Bedingungen [WATANABE et al., 2005] gezeigt werden. SORG et al. [2009] wiesen unter Verwendung eines Mausmodells nach, dass EPO dosisabhängig die Wundheilung in tiefen Hautdefekten verbessert. Dabei konnten im Vergleich zu Kontrollen neben einem dichteren mikrovaskulären Netzwerk auch eine beschleunigte Epithelialisierung des Wunddefekts beobachtet werden. WATANABE et al. [2005] fanden in den Glaskörpern der Augen von 73 Patienten mit ischämischer Retinopathie erhöhte EPO-Konzentrationen verglichen mit Patienten ohne ischämischer Retinopathie. Darauf basierend zeigten WATANABE et al. [2005], dass EPO die Proliferation von bovinen retinalen mikrovaskulären Endothelzellen erhöht,

und dass die Proliferation durch Zugabe von EPO-bindendem löslichem EpoR vermindert werden kann. Gleichzeitig stellt EPO einen potenten Inhibitor des apoptotischen Zelltodes in hämatopoetischem als auch nicht-hämatopoetischem Gewebe dar [SOCOLOVSKY et al., 2001; ALURAL et al., 2014]. Durch diese Wirkung könnte EPO auch die Viabilität von mikrovaskulären Fragmenten verbessern. **Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Hypothese geprüft werden, dass eine Behandlung mit EPO das Vaskularisierungspotential und die Viabilität mikrovaskulärer Fragmente verbessert.**

Um die Auswirkungen einer Kryokonservierung bzw. einer EPO-Behandlung auf mikrovaskuläre Fragmente zu analysieren, wurden in dieser Arbeit kryokonservierte bzw. EPO-behandelte Fragmente mit frisch isolierten bzw. mit Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten aus dem epididymalen Fettgewebe von Mäusen verglichen. Abhängig vom Studienabschnitt wurde zunächst ihre Morphologie, zelluläre Zusammensetzung, Viabilität, Proliferation, Proteinexpression und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in einem kontrollierten *in vitro* Versuchsaufbau untersucht. Zusätzlich wurden Integra[®]-Scaffolds mit kryokonservierten bzw. EPO-behandelten sowie frischen bzw. Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Spendermäusen besiedelt. Die prävascularisierten Scaffolds wurden anschließend in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp-Empfängermäusen implantiert. Auf diese Weise konnte die Vaskularisierung der Implantate über einen Zeitraum von 14 Tagen durch repetitive intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie Histologie und Immunhistochemie analysiert werden.

4. ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, neue Strategien zur Verbesserung der Nutzbarkeit und des Vaskularisierungspotentials von mikrovaskulären Fragmenten für das Tissue Engineering zu etablieren. Im **ersten Studienabschnitt** der Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass eine Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten möglich ist, ohne dabei ihr Vaskularisierungspotential zu beeinflussen. Hierbei sollten folgende Fragestellungen näher geklärt werden:

1. Wird durch eine Kryokonservierung die physiologische Morphologie und die zelluläre Zusammensetzung mikrovaskulärer Fragmente verändert?
2. Führt eine Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente zu einer reduzierten Viabilität, Proteinexpression und Sekretion von Wachstumsfaktoren?
3. Weisen kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente im Vergleich zu frisch isolierten Kontrollen ein verschlechtertes Vaskularisierungspotential auf?

Im **zweiten Studienabschnitt** der Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass eine Behandlung mit EPO das Vaskularisierungspotential und die Viabilität mikrovaskulärer Fragmente verbessert. Hierbei sollten folgende Fragestellungen näher geklärt werden:

1. Verbessert eine Behandlung mit EPO die Viabilität, Proliferation und Proteinexpression mikrovaskulärer Fragmente?
2. Verbessert eine Behandlung mit EPO das *in vivo* Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Versuchstiere

Zur Isolierung mikrovaskulärer Fragmente wurde das Nebenhodenfettgewebe von 8-14 Monate alten, männlichen C57BL/6 Wildtyp Mäusen (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) und C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Mäusen (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) mit einem Körpergewicht von mindestens 30 g entnommen. Für sämtliche Versuche am Modell der Rückenhautkammer wurden 4-6 Monate alte C57BL/6 Wildtyp Mäuse aus eigener Zucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie) mit einem Körpergewicht von 22-28 g verwendet.

Während der Versuche wurden die Tiere in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum (Temperatur: 22°C) bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Gabe von Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) erfolgte *ad libitum*.

Die Experimente wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Abteilung Lebensmittel und Veterinärwesen, Saarbrücken) genehmigt (Genehmigungsnummer: 08/2015) und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes entsprechend den nationalen sowie europäischen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

5.2. Isolierung und Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

5.2.1. Isolierung mikrovaskulärer Fragmente

Männlichen Spendermäusen wurde das Nebenhodenfettgewebe nach medianer Laparotomie entnommen (*Abbildung 2A*). Dazu wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Narkoselösung bestehend aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht (KG); Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG;

Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland), narkotisiert. Es erfolgte die Rasur des Bauches mithilfe eines Elektrorasierers (Elektra II GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) sowie eine anschließende Reinigung der Haut mit warmen Wasser und Desinfektionslösung (Softasept N, Braun, Melsungen, Deutschland). Nach der Eröffnung des Bauches wurde die Aorta inzidiert und das Tier auf diese Weise durch Ausbluten getötet. Die bilateralen epididymalen Fettpolster wurden entnommen (*Abbildung 2B*), in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline (PBS); Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen und in 10 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; Biochrom, Berlin, Deutschland) bis zur weiteren Verarbeitung überführt.

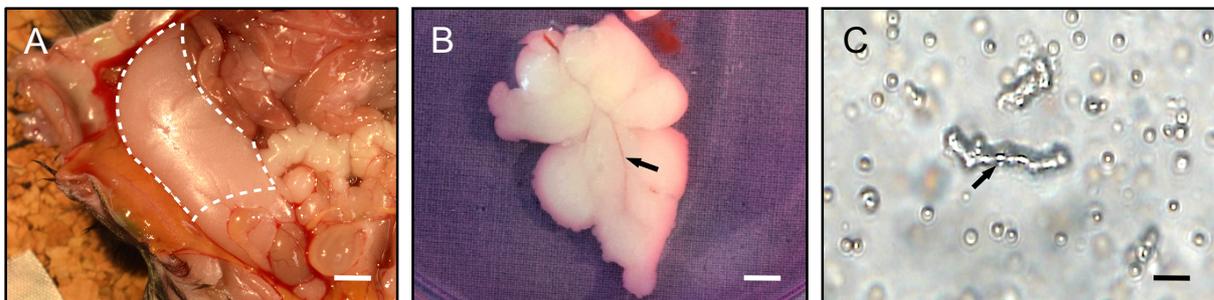


Abbildung 2: **A:** Nebenhodenfettgewebe einer männlichen Spendermaus *in situ* (späterer Absetzungsrand mit unterbrochener Linie markiert). **B:** Exzidiertes Nebenhodenfettgewebe mit sichtbarer Gefäßstruktur (Pfeil). **C:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines mikrovaskulären Fragments (Pfeil) direkt nach Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe. Maßstab: A: 5 mm; B: 4 mm; C: 15 μ m.

Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde das Gewebe mit einer Mikroschere fein zerkleinert und durch den Einsatz von Kollagenase NB4 (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) unter starkem Rühren für 9 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) digestiert. Dieser Prozess zerstörte die Fettzellen, während die mikrovaskulären Fragmente durch die kurze Digestionsdauer geschont wurden. Daraufhin wurde durch die Zugabe von PBS + 20 % fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom GmbH) der Digestionsprozess durch Neutralisation der Kollagenase gestoppt und die entstandene Suspension für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der sich dabei absetzende Fettüberstand wurde anschließend abgenommen. Der Zyklus aus Inkubation und Abnahme des Überstandes wurde drei- bis fünfmal wiederholt, um die maximale Menge an überschüssigem Fettüberstand von den sich absetzenden mikrovaskulären Fragmenten zu trennen. Die verbliebene Zell-Gefäß-Suspension

wurde durch einen Filter mit einer Porengröße von 500 µm (pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland) gefiltert, um verklumptes bzw. unverdautes Gewebe zu entfernen. Zur Anreicherung der mikrovaskulären Fragmente (*Abbildung 2C*) in einem kleinen Volumen wurde die Suspension 5 Minuten bei 120 x g zentrifugiert. Schließlich wurde das gewonnene Pellet in 10 µl PBS + 20 % FKS resuspendiert, um ein Verklumpen der mikrovaskulären Fragmente zu verhindern.

5.2.2. Kryokonservierung

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Kryokonservierung auf das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente analysiert. Dabei wurde die eine Hälfte der frisch isolierten mikrovaskulären Fragmente einer Spendermaus direkt als Kontrolle zu weiteren Untersuchungen benutzt, während die andere Hälfte in 10 µl PBS + 20 % FKS (Biochrom GmbH) resuspendiert wurde.

Die resuspendierten mikrovaskulären Fragmente wurden anschließend sofort in ein spezielles Röhrchen zur Kryokonservierung (Nalgene; Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) transferiert. In dieses wurden langsam 1,8 ml auf 4 °C vorgekühltes Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGM-MV; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 50 % FKS hinzugegeben. Dabei fungierte DMSO in der vorliegenden Arbeit als Kryoprotektor. DMSO verringert durch die Stabilisierung der flüssigen Phase des intrazellulären Wassers die Wahrscheinlichkeit der Kristallbildung mit nachfolgendem Zellschaden [MERYMAN, 1971; MANDUMPAL et al., 2011]. Da das DMSO hierzu die Zellmembran durchqueren muss, wurde durch die langsame Zugabe gewährleistet, dass nicht das DMSO selbst osmotische Zellschädigungen induzierte.

Die Probe wurde anschließend in einen Einfrierbehälter (Nalgene; Fisher Scientific) transferiert und mit einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C heruntergekühlt [SONG et al., 1995]. Die Probe wurde so für 24 h gelagert. Das gekühlte Kryoröhrchen mit den mikrovaskulären Fragmenten wurde dann in einen Stickstofftank überführt und für sechs Tage bei -196 °C aufbewahrt. Nach insgesamt sieben Tagen Lagerungszeit wurde das Röhrchen aus dem Stickstofftank entfernt

und in ein 37 °C warmes Wasserbad getaucht, bis makroskopisch keine Eiskristalle mehr erkennbar waren. Durch Zentrifugation der Probe bei 120 x g und anschließender Entfernung des Überstandes wurde das bei Raumtemperatur zytotoxische DMSO möglichst rasch entfernt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Daraufhin wurden die mikrovaskulären Fragmente bei 37 °C in ECGM-MV äquilibriert und nach Resuspension in 10 µl PBS + 20 % FKS für *in vitro* sowie *in vivo* Analysen genutzt.

5.2.3. Kultivierung in EPO- oder Vehikel-supplementiertem Medium

Im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit wurden die Effekte einer EPO-Behandlung auf die mikrovaskulären Fragmente analysiert. Dazu erfolgte eine Vorbehandlung der mikrovaskulären Fragmente mit EPO oder mit Vehikel (0.9 % NaCl) als Kontrolle. Direkt nach der Isolierung wurde eine Hälfte der mikrovaskulären Fragmente aus dem epididymalen Fettgewebe einer Spendermaus für 24 h unter konstanten atmosphärischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) in einer 24-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) in ECGM-MV (PromoCell) kultiviert. Das Medium enthielt 20 IU/ml Epoetin beta (NeoRecormon®; Roche, Basel, Schweiz). Die andere Hälfte der isolierten mikrovaskulären Fragmente diente als Kontrolle und wurde entsprechend für denselben Zeitraum unter identischen Bedingungen in ECGM-MV kultiviert, welches als Vehikel 0,9 % NaCl (Braun) enthielt. Nach Ende der Kultivierungsperiode wurden die vorbehandelten Fragmente einmalig in PBS gewaschen, in 10 µl PBS + 20 % FKS (Biochrom GmbH) resuspendiert und für *in vitro* sowie *in vivo* Analysen benutzt.

5.3. *In vitro* Analysen

5.3.1. Techniken zur Analyse mikrovaskulärer Fragmente

Um den Einfluss einer Kryokonservierung bzw. einer Behandlung mit EPO auf mikrovaskuläre Fragmente zu untersuchen, wurden verschiedene qualitative und

quantitative Analysen direkt nach Kryokonservierung bzw. Isolierung (*siehe Studienabschnitt 1*) sowie nach 24-stündiger Kultivierung mit EPO bzw. Vehikel (*siehe Studienabschnitt 2*) durchgeführt.

Dazu zählten im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die quantitative Bestimmung der Anzahl der verfügbaren mikrovaskulären Fragmente, deren Längenverteilung sowie ihre zelluläre Zusammensetzung. Funktionell wurden in diesem Studienabschnitt die Viabilität der Fragmente, deren Proteinexpression und ihre Sekretion von Wachstumsfaktoren analysiert. Dabei wurden stets kryokonservierte mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten aus einem identischen Spendertier verglichen.

Im zweiten Studienabschnitt beschränkte sich die *in vitro* Untersuchung der mikrovaskulären Fragmente auf die Bestimmung der Viabilität, Proliferation und Proteinexpression. Dazu wurden EPO- und Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente aus identischen Spendertieren miteinander verglichen.

5.3.2. Strukturelle und morphologische Analysen

5.3.2.1. Anzahl

Um zu überprüfen, ob die im ersten Studienabschnitt durchgeführte Kryokonservierung zu quantitativen Verlusten an verfügbaren mikrovaskulären Fragmenten führt, wurde die Anzahl kryokonservierter mikrovaskulärer Fragmente mit frisch isolierten Kontrollen verglichen. Hierzu wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem gesamten Nebenhodenfettgewebe einer Spendermaus isoliert und in zwei Hälften aufgeteilt. Während die eine Hälfte erst nach einwöchiger Kryokonservierung auf die Anzahl mikrovaskulärer Fragmente untersucht wurde, erfolgte die Analyse der anderen Hälfte direkt nach Isolierung. Dazu wurden die mikrovaskulären Fragmente 1:40 in PBS (Biochrom GmbH) verdünnt und in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert. Die Auszählung erfolgte manuell mithilfe eines BZ-8000 Mikroskopsystems (Keyence; Osaka, Japan). Hierzu wurde das komplette Well in 20-facher Vergrößerung abgefahren und alle sichtbaren mikrovaskulären Fragmente gezählt.

5.3.2.2. Längenverteilung

Die Längenverteilung mikrovaskulärer Fragmente nach Kryokonservierung wurde im ersten Studienabschnitt mit der Längenverteilung frisch isolierter Fragmente verglichen. Dazu wurden alle nach dem Auftauprozess bzw. direkt nach der Isolierung verfügbaren mikrovaskulären Fragmente in 400 µl PBS (Biochrom GmbH) resuspendiert. Jeweils 100 µl der Suspension wurden in ein Well einer 48-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) transferiert. Die Analyse erfolgte mittels eines BZ-8000 Mikroskopsystems (Keyence). Dabei wurden pro Well vier vorher festgelegte Bildausschnitte in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und später im Standbild ausgewertet. Zur Längenmessung der Fragmente wurde die Analysesoftware Biozero (Version 3.60; Keyence) genutzt, wobei die mikrovaskulären Fragmente der Länge nach manuell auf dem Computerbildschirm markiert wurden. Die Länge von mindestens 300 Fragmenten pro Gruppe konnte so gemessen und prozentual in Intervallen von 10 µm eingeordnet werden. Darüber hinaus wurde die durchschnittliche Gefäßlänge aller gemessenen mikrovaskulären Fragmente in µm berechnet.

5.3.2.3. Zelluläre Zusammensetzung

Um zu analysieren, ob eine Kryokonservierung die zelluläre Zusammensetzung mikrovaskulärer Fragmente verändert, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die mikrovaskulären Fragmente durch 30-minütige Digestion mittels Akkutase® (BioLegend, Fell, Deutschland) auf einer Heizplatte bei 37 °C in Einzelzellen zerteilt. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde auf die Expression verschiedener Marker untersucht. Dazu gehörten der Ratte-Anti-Maus Endothelzellmarker CD31-Phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), die monoklonalen Ratte-Anti-Maus Stroma-/Stammzell-Oberflächenmarker CD13-Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC), CD73-FITC und CD117-FITC (alle BD Pharmingen) sowie die Markerkombination für endotheliale Vorläuferzellen Ratte-Anti-Maus Sca-1-FITC (BD Pharmingen) und VEGF-Rezeptor (VEGFR)-2-PE (BD Pharmingen). Als Kontrollen dienten Isotyp-identisches Ratten IgG-PE und IgG-FITC (BD Pharmingen). Die Durchflusszytometrie wurde mithilfe

eines FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und die resultierenden Daten mit dem Software-Paket CellQuest Pro (BD Biosciences) ausgewertet. Der Anteil an Zellen mit einem bestimmten Marker wurde in Prozent angegeben.

5.3.3. Funktionelle Analysen

5.3.3.1. Viabilität

Die Viabilität mikrovaskulärer Fragmente nach Kryokonservierung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden die Fragmente in 400 µl PBS (Biochrom GmbH) suspendiert und für 10 min mit 2 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) zur Visualisierung der Zellkerne sowie zusätzlich mit 2 µg/ml Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) gefärbt. Beide Stoffe können an die zelluläre DNA binden. Propidiumiodid ist jedoch nur in der Lage, die Zellmembran stark geschädigter Zellen zu durchdringen. Da dieser Farbstoff eine rötliche Färbung aufweist, können nekrotische Zellen auf diese Weise identifiziert werden. Jeweils 100 µl der so gefärbten Suspension wurden in ein Well einer 48-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) transferiert. Die Analyse von mindestens 12 mikrovaskulären Fragmenten pro Gruppe erfolgte in 20-facher Vergrößerung mittels eines BZ-8000 Mikroskopsystems (Keyence). Der Anteil toter Zellen wurde in Prozent angegeben.

5.3.3.2. Proteinexpression

Um zu analysieren, ob eine Kryokonservierung bzw. eine Behandlung mit EPO die Expression verschiedener Angiogenese-assoziiierter Proteine innerhalb der mikrovaskulären Fragmente verändert, wurde im Rahmen beider Studienabschnitte der vorliegenden Arbeit ein Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Array (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden pro Studienabschnitt die mikrovaskulären Fragmente aus dem Fettgewebe von 14 Mäusen isoliert. Die mikrovaskulären Fragmente wurden zu einer Hälfte entsprechend den oben genannten Protokollen entweder einer Kryokonservierung

bzw. einer Behandlung mit EPO unterzogen, während die andere Hälfte als zugehörige Kontrollen behandelt wurde. Anschließend wurden die Fragmente zur Proteinextraktion mittels eines Lysepuffers (10 mmol/l Tris pH 7,5, 10 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN₃, 0,2 mmol/l PMSF, Protease-Inhibitor Mischung 1:1,75 vol. %, Phosphatase-Inhibitor Mischung 1:100 vol. %; Sigma-Aldrich) auf Eis inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationsperiode wurden die Suspensionen für weitere 30 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde als Proteinextrakt genutzt. Pro Versuchsgruppe wurden 250 µg Protein analysiert.

Die Proteinproben wurden für 1 h bei Raumtemperatur einer Lösung ausgesetzt, die 53 biotinylierte Antikörper (bAk) gegen lösliche Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, Matrixkomponenten, membrangebundene Rezeptoren und intrazelluläre Signalmoleküle enthielt. Die so markierte Protein-Antikörper-Mischung wurde anschließend bei 4 °C über Nacht an einer Membran inkubiert, welche auf ihrer Oberfläche entsprechend lokalisierte Fänger-Antikörper (FAk) gegen die zu detektierenden 53 Proteine aufwies. Die Visualisierung der fixierten FAk-Protein-bAk-Komplexe wurde durch die Zugabe von Chemilumineszenz-fähigen Substraten initiiert, deren lichtemittierende Reaktion durch Streptavidin-Meerrettichperoxidase katalysiert wurde. Das Ausmaß dieser Reaktion und damit die Quantifizierung der gebundenen Proteinmenge konnte mittels eines Intas ECL Chemocam Imagers (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt werden. Die Proteinexpression der jeweiligen Kontrollen diente als Basiswert. Die Proteinexpression der kryokonservierten bzw. EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmente wurde als prozentuale Veränderung von diesem Wert angegeben.

5.3.3.3. Sekretion von Wachstumsfaktoren

Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus mikrovaskulären Fragmente nach Kryokonservierung wurden mittels Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysiert. Hierzu wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem Fettgewebe von 12 Spendermäusen isoliert. Dabei wurde die eine Hälfte der mikrovaskulären Fragmente vor der Analyse kryokonserviert, während die andere Hälfte direkt nach der Isolierung als Kontrolle untersucht wurde. Die Fragmente wurden unmittelbar vor der

eigentlichen Analyse für 72 h unter konstanten atmosphärischen Bedingungen (37°C, 5 % CO₂) in 600 µl ECGM-MV (PromoCell) in einer 48-Well-Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden von jedem Well 100 µl des Überstandes mittels ELISA untersucht. Dabei erfolgte mithilfe von ELISA-Kits (VEGF: R&D Systems; bFGF: RayBiotech, Norcross, GA, USA) die Konzentrationsbestimmung der in das Medium abgegebenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF. Die hierbei ermittelten Werte wurden mit Kontrollwerten von Messungen in reinem Kulturmedium korrigiert und in pg/mg angegeben.

5.4. Prävascularisierte Scaffolds

5.4.1. Prozessierung der Scaffolds

Als Ausgangsmaterial zur Prozessierung der Scaffolds für die Experimente wurden 1,3 mm-dicke Kollagen-Glykosaminoglykan Matrices (Integra® Dermal Regeneration Template Single Layer; Integra Life Sciences, Ratingen, Deutschland) benutzt (*Abbildung 3*). Diese Matrices werden seit einigen Jahren sowohl in der Verbrennungschirurgie als auch in der plastischen Chirurgie zur Deckung von großflächigen Hautdefekten benutzt. Das Biomaterial besteht zu 98 % aus Poren (*Abbildung 3B*) mit einem Durchmesser von 30 - 120 µm (*Abbildung 3C*).

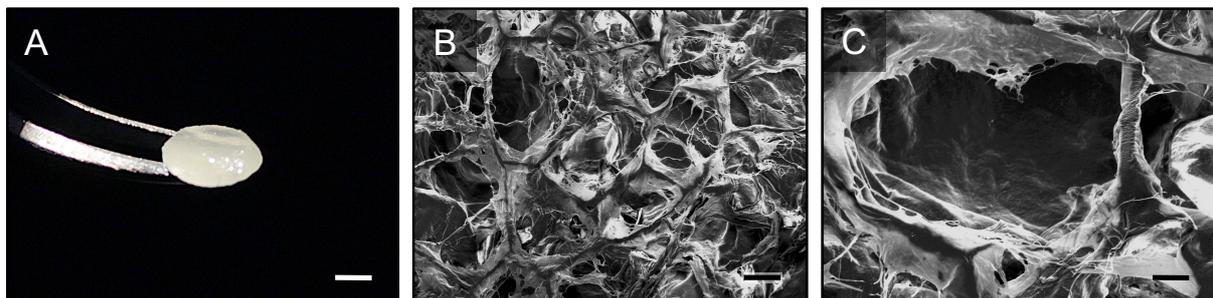


Abbildung 3: *A:* Integra®-Scaffold auf einer Pinzette direkt nach Präparation. *B, C:* Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Integra®-Scaffolds direkt nach Präparation. Das Material weist neben einer trabekulären Struktur (*B*) eine Vielzahl zufällig verteilter Poren (*C*) auf. Maßstab: *A:* 1,2 mm. *B:* 40 µm. *C:* 12 µm.

So können Fibroblasten eines Patienten in die Poren der Matrix einwachsen und eine narbenfreie Wundheilung ermöglichen. Dabei fällt die immunologische

Fremdkörperreaktion auf das Biomaterial gering aus [BURKE et al., 1981; STERN et al., 1990]. Innerhalb von ungefähr 30 Tagen wird die Matrix vom Körper abgebaut und dient bis dahin als Leitstruktur für neugebildetes Gewebe [SHAHROKHI et al., 2014]. Für die vorliegende Arbeit wurden aus der Integra[®]-Matrix zylinderförmige Scaffolds mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Höhe von 1,3 mm (*Abbildung 3A*) mittels einer Biopsiestanze (Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland) herausgeschnitten. Die Scaffolds wurden nach Besiedlung mit mikrovaskulären Fragmenten für weitere Experimente benutzt.

5.4.2. Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten

Die Besiedlung der Integra[®]-Scaffolds erfolgte entweder im Anschluss an die Kryokonservierung bzw. direkt nach Isolierung (*siehe Studienabschnitt 1*) oder nach 24-stündiger Kultivierung mit EPO bzw. Vehikel (*siehe Studienabschnitt 2*) der mikrovaskulären Fragmente. Hierzu wurden die Scaffolds auf ein 500 µm-Sieb (pluriSelect Life Science) platziert. Anschließend wurden 10 µl PBS, welche die resuspendierten Fragmente enthielten, mit einer 100 µl-Pipette (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) auf die Oberfläche der Matrizes pipettiert. Danach wurde mit einer 1 ml-Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences) ein Unterdruck auf der gegenüberliegenden Unterseite der Scaffolds erzeugt, um auch zentrale Regionen des Materials mit Gefäßen zu besiedeln. Die auf diese Weise prävascularisierten Integra[®]-Scaffolds wurden für weitere *in vitro* Untersuchungen sowie zur *in vivo* Implantation benutzt.

5.4.3. Oberflächenmorphologie

Die Oberfläche der prävascularisierten Integra[®]-Scaffolds wurde im ersten Studienabschnitt mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Forschungslabor der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes von Herrn Dr. Wolfgang Metzger durchgeführt.

Mit mikrovaskulären Fragmenten beladene Integra[®]-Scaffolds wurden mithilfe

von 2 % Glutaraldehyd (Science Services GmbH, München, Deutschland) in 0,1 M Natriumkakodylat-Puffer (pH 7,4; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung fixiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen der Proben für 10 min mittels 0,1 M Natriumkakodylat-Puffer und eine Dunkelkammer-Inkubation von 1 h unter Bewegung in Osmiumtetroxid (1 vol. % in 0,2 M Natriumkakodylat-Puffer; Science Services GmbH). Anschließend wurden die besiedelten Scaffolds viermal für 10 min in deionisiertem Wasser (dH₂O) gereinigt. Das dH₂O konnte durch Inkubation mit einer ansteigenden Ethanol-Reihe (70, 80, 90, 96, 100 vol.%) entfernt werden. Die Dehydratation wurde durch das Waschen mittels einer 1:2-Lösung von 100 vol. % Ethanol und Hexamethyldisilazan (HDMS; Carl Roth GmbH & Co. KG) sowie zuletzt mittels reinem HDMS abgeschlossen. Die Proben wurden anschließend für eine Nacht mit HDMS bedeckt und am nächsten Tag auf eine leitende Kohlenstoffoberfläche (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) übertragen. Dort wurden die Proben dreimal mit Gold (Sputter Coater SC 7640; Quorum Technologies (Polaron), Ontario, Kanada) bestäubt, um ihre elektrische Leitfähigkeit als Voraussetzung zur Elektronenmikroskopie sicherzustellen. Abschließend erfolgte die Untersuchung der Probenoberfläche mittels eines FEI XL 30 ESEM FEG Geräts (FEI, Hillsboro, OR, USA) unter Vakuumbedingungen mit einer Beschleunigungsspannung von 5kV im Secondary Electron (SE)-Modus.

5.5. Modell der Rückenhautkammer

5.5.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Zur Untersuchung des Vaskularisierungspotentials mikrovaskulärer Fragmente wurde das Modell der Rückenhautkammer verwendet (*Abbildung 4*). SANDISON [1924] nutzte erstmals eine transparente Kammer zur Beobachtung von Gewebeprozessen am Ohr eines Kaninchens. ALGIRE [1943] übertrug den Ansatz einige Jahre später auf die Rückenhautfalte der Maus. Die für die Kammer genutzten Materialien und die Operationstechnik wurden in den folgenden Jahrzehnten verfeinert [LEHR et al., 1993]. Die Rückenhautkammer dient heute als etabliertes

Tiermodell zur repetitiven *in vivo* Analyse mikrovaskulärer Prozesse. Durch intravenöse Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht das Modell unter Zuhilfenahme der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Visualisierung der gesamten Mikrozirkulation des quergestreiften Hautmuskels, des darunterliegenden Subkutangewebes sowie implantierter Biomaterialien.

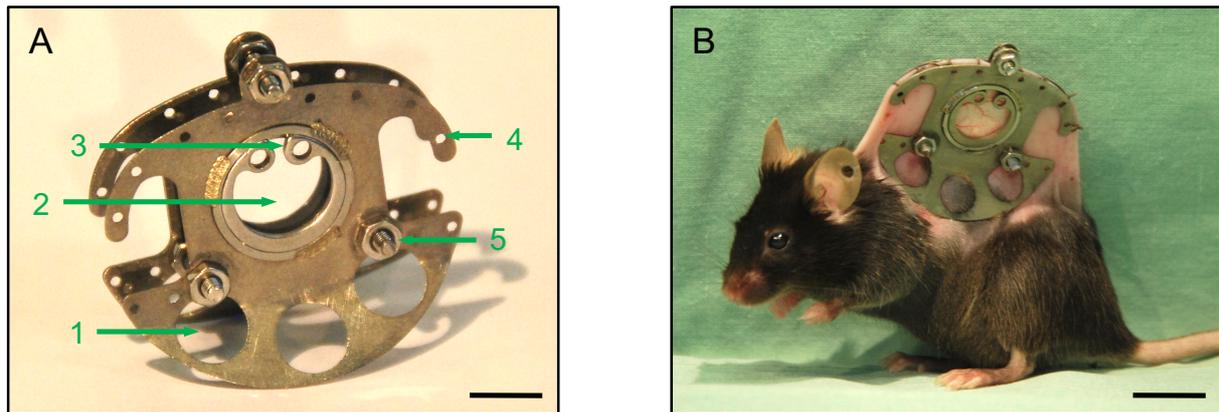


Abbildung 4: **A:** Rückenhautkammer für die Maus, bestehend aus zwei symmetrischen Titanrahmen und einem zentralen Beobachtungsfenster (Gewicht: 2,2 g). 1: Gewichtsreduzierende Materialausparung; 2: Beobachtungsfenster, verschlossen mit Deckglas und Sprengring; 3: Sprengring zur Fixierung des Deckglases; 4: Bohrung für Fixationsfäden; 5: Verbindungsschraube mit Schraubenmutter. **B:** C57BL/6 Maus 48 h nach Implantation der Rückenhautkammer. Maßstab: A: 7 mm; B: 14 mm.

Analysen in der Rückenhautkammer sind innerhalb eines Zeitraums von bis zu zwei Wochen wiederholt möglich. Dabei kann sowohl die Entwicklung neuer Blutgefäße als auch die Reperfusion präformierter Gefäße untersucht werden. Die Vaskularisierung von transplantierten Geweben oder implantierten Biomaterialien kann auf diese Weise zuverlässig unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen beurteilt werden. Im Modell der Rückenhautkammer wurde beispielsweise bereits die Vaskularisierung von spongiösem Knochen [FUNK et al., 1986], Tumorgewebe [LASCHKE et al., 2013] oder synthetischem Biomaterial [LASCHKE et al., 2016] untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Rückenhautkammern in C57BL/6 Wildtyp Mäuse implantiert, während Integra®-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten aus transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Os/J Mäusen besiedelt wurden. Diese transgene Mauslinie ist mit einer cDNA transfiziert, welche das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) kodiert. Die cDNA wird über einen Cytomegalie-Enhancer und einen Huhn- β -Aktin-Promotor gesteuert. Nahezu alle Gewebe, mit

Ausnahme von Erythrozyten und Haaren, exprimieren in den transgenen Tieren GFP. Durch blaues Anregungslicht der Wellenlänge 488 nm oder mittels immunhistochemischer Färbung kann das Protein detektiert werden [OKABE et al., 1997]. In den durchgeführten Experimenten konnten die GFP-positiven mikrovaskulären Fragmente auf diese Weise von den GFP-negativen Gefäßen des Empfängergewebes sicher unterschieden werden.

5.5.2. Präparation der Rückenhautkammer

Die Präparation der Rückenhautkammer in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen erfolgte in Allgemeinanästhesie. Die Narkose wurde mittels i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG; Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg AG) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG; Rompun[®], Bayer) durchgeführt. Es erfolgte die Enthaarung des Operationsgebietes durch Elektrorasur (Elektra II GH 204, Aesculap) sowie chemischer Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland). Anschließend wurde die Rückenhaut mit warmen Wasser gesäubert und mit Alkohollösung (Softasept N, Braun) desinfiziert.

Vor der eigentlichen Präparation der Kammer wurde das Tier in Bauchlage positioniert, die elastische Rückenhaut entlang der Mittellinie angehoben und mittels zweier Haltefäden fixiert (*Abbildung 5A*).

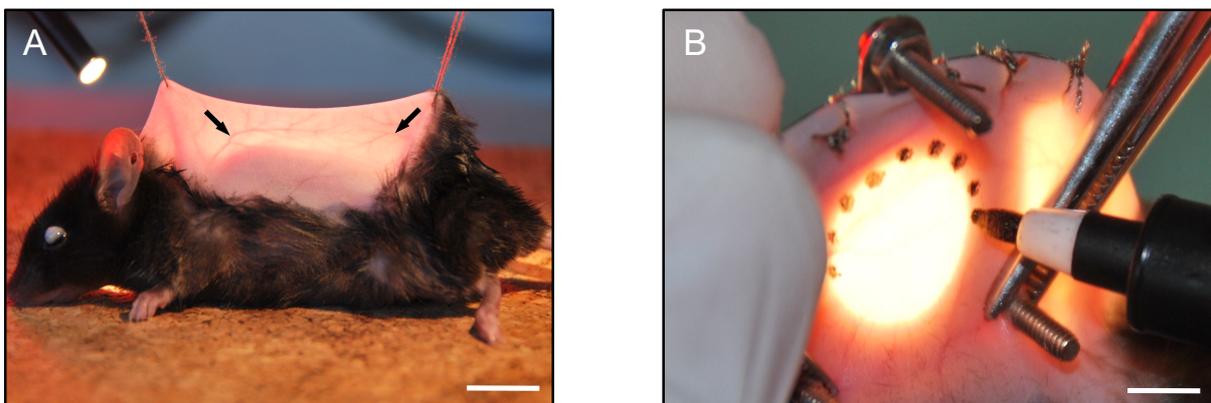


Abbildung 5: **A:** Aufspannen der Rückenhaut entlang der Mittellinie mittels zweier Haltefäden unter Gegenlichtkontrolle zur Darstellung der versorgenden Hauptgefäße (Pfeile). **B:** Markierung des Präparationsareals unter Gegenlichtkontrolle nach Implantation des hinteren Kammerrahmens. Maßstab: A: 13 mm; B: 5 mm.

Unter Gegenlichtkontrolle war es somit möglich, die Rückenhaut-versorgenden Hauptgefäße darzustellen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Gefäße in der nachfolgenden Operation nicht komprimiert oder verletzt werden, um so eine physiologische Blutversorgung des Gewebes im Beobachtungsfenster zu garantieren.

Der rückwärtige Kammerrahmen (Irola Industriekomponenten GmbH & Co. KG, Schonach, Deutschland) wurde anschließend an seinem oberen Rand mit Nahtfäden am oberen Rand der Hautfalte fixiert, so dass der Rahmen in der Mitte des Rückens positioniert war. Im basalen Bereich der Hautfalte wurden mit einer Präparierschere zwei kleine Inzisionen für die beiden Befestigungsschrauben des Kammerrahmens geschaffen. Um die Fixierung des Rahmens und die anhaltende Spannung des Operationsfeldes zu gewährleisten, wurde auf die Schrauben jeweils eine Klemme gesetzt. Vor Lösung der Haltefäden wurde der Bereich des abzutragenden Gewebes für das spätere Beobachtungsfenster unter erneuter Gegenlichtkontrolle markiert (*Abbildung 5B*). Obwohl das Beobachtungsfenster nur einen zirkulären Durchmesser von 10 mm aufweist, wurde ein Areal von etwa 15 mm Durchmesser eingezeichnet. Auf diese Weise wurde eine physiologische Durchblutung des Areals ohne Gewebekompression nach Anbringen des vorderen Kammerrahmens sichergestellt.

Anschließend wurden die Haltefäden entfernt und die Maus in Seitenlage fixiert. Im nächsten Schritt konnten unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leica, Wetzlar, Deutschland) im gekennzeichneten Bereich die Cutis, die Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel (*Musculus panniculus carnosus*) sowie die beiden Schichten des *Musculus retractor* operativ entfernt werden (*Abbildung 6A*).

Die verbliebenen Gewebeschichten der kontralateralen Seite, bestehend aus Cutis, Subcutis und quergestreiftem Hautmuskel der Gegenseite (*Abbildung 6B*), wurden mehrfach mit steriler Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde der vordere Kammerrahmen aufgesetzt. Dieser wurde in einem Abstand von etwa 500 µm vom gegenseitigen Rahmen mit Stahlmuttern auf den Verbindungsschrauben fixiert. Das Beobachtungsareal wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen durch ein Deckglas abgedeckt, welches durch Adhäsion dem freipräparierten Muskel anhaftete und mit einem Sprengring gesichert wurde. Sowohl Deckglas als auch

Sprengring waren jederzeit entfernbar, um die Zugänglichkeit zur Kammer zu einem späteren Zeitpunkt zu gewährleisten.

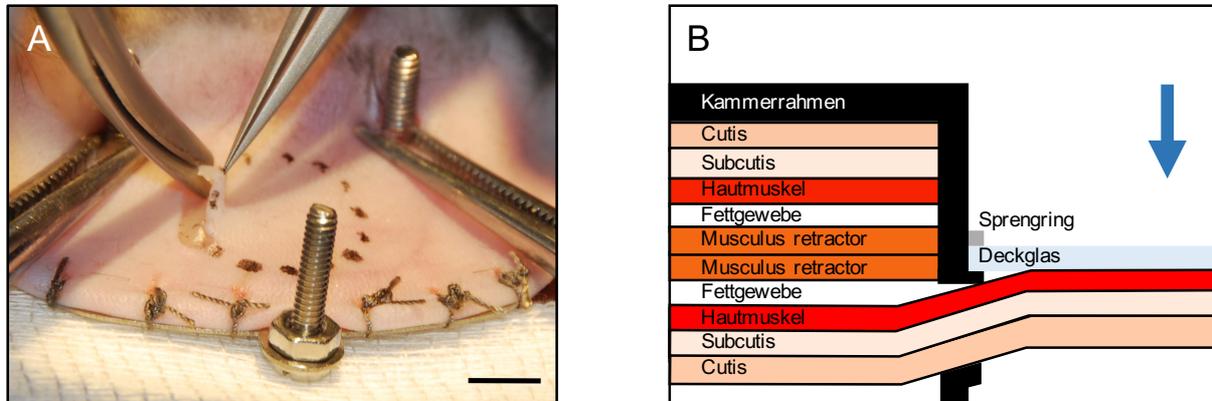


Abbildung 6: **A:** Präparation des späteren Beobachtungsareals bis auf den Hautmuskel der Gegenseite. Maßstab: 5 mm. **B:** Schematischer Querschnitt durch die Rückenhautfalte (links) und die präparierte Rückenhautkammer (rechts). Der freigelegte Hautmuskel ist zum Schutz mithilfe eines Deckglases abgedeckt. Die auflichtmikroskopische Untersuchung der Kammer erfolgt aus der mit Pfeil markierten Richtung.

Im Anschluss wurde den Versuchstieren eine Erholung von der Narkose und dem chirurgischen Trauma über einen Zeitraum von 48 h gewährt, bevor die Versuche fortgesetzt wurden. Die Mäuse tolerierten die Rückenhautkammer gut, was sich an einem regelrechten Putz-, Fress- und Schlafverhalten zeigte.

5.5.3. Implantation prävaskularisierter Scaffolds

Zur Implantation eines prävaskularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer wurde das narkotisierte Versuchstier auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne fixiert. Nach Entfernung des Sprengrings sowie des Deckglases erfolgte unter operationsmikroskopischer Sicht die Platzierung eines prävaskularisierten Integra®-Scaffolds in das Zentrum des Beobachtungsfensters (Abbildung 7).

Anschließend wurden einige Tropfen einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung (Braun) in das Beobachtungsfenster hinzugegeben, um beim Verschluss der Kammer mittels Deckglas und Sprengring Luftschlüsse zu vermeiden. Das Implantat und die Kammer wurden direkt im Anschluss an die Implantation mithilfe eines Stereo-Mikroskops inspiziert.

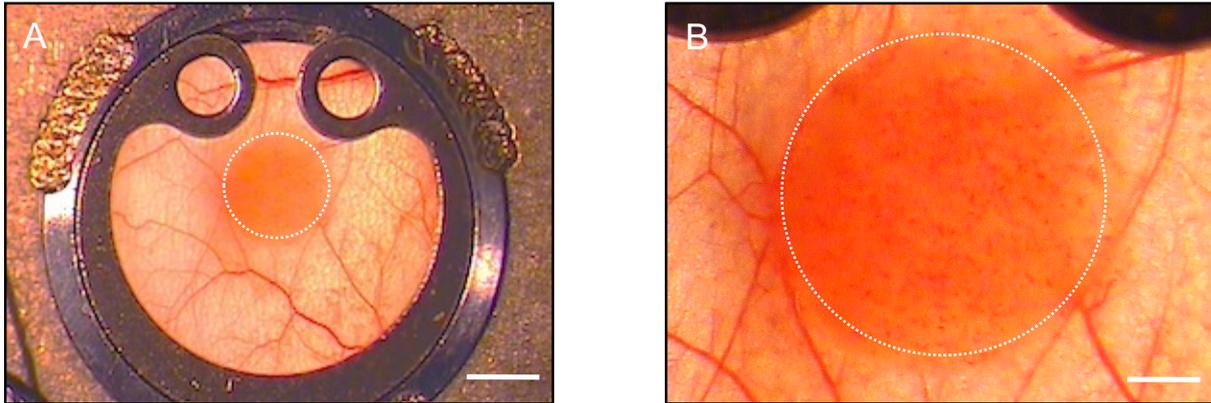


Abbildung 7: Stereomikroskopische Übersichts- (A) und Nahaufnahme (B) eines prävascularisierten Integra®-Scaffolds (Ränder mit gepunkteter Linie markiert) direkt nach Implantation in die Rückenhautkammer. Das Beobachtungsfenster ist mittels Deckglas und Sprengring verschlossen. Maßstab: A: 2 mm; B: 0,7 mm.

5.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Technik der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, am lebenden Tier über einen mehrere Wochen andauernden Zeitraum repetitiv mikrohämodynamische Parameter zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Weise die Vaskularisierung der prävascularisierten Integra®-Scaffolds innerhalb der Rückenhautkammern untersucht.

Vor jeder Untersuchung wurde das Versuchstier mittels i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG; Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG; Rompun®, Bayer) narkotisiert. Daraufhin konnte das Tier auf einer Plexiglasbühne fixiert werden, so dass die Rückenhautkammer inklusive Beobachtungsfenster in einer waagrechten Position zu liegen kam. Zunächst erfolgte eine Mikroskopie ohne Kontrastmittel, um in Blaulicht-Epi-Illumination die transplantierten GFP-positiven Gefäße auf dem Scaffold visualisieren zu können. Anschließend erfolgte zur Färbung des Blutplasmas die retrobulbäre Injektion von 0,1 ml FITC-markiertem Dextran (5 %; Sigma-Aldrich). Dieser Plasmamarker verblieb durch sein Molekulargewicht von 150.000 Da während des Untersuchungszeitraums größtenteils intravasal [FAYE et al., 2012]. Dadurch konnte das Blutgefäßsystem in Blaulicht-Epi-Illumination kontrastreich dargestellt werden (Abbildung 8A und B).

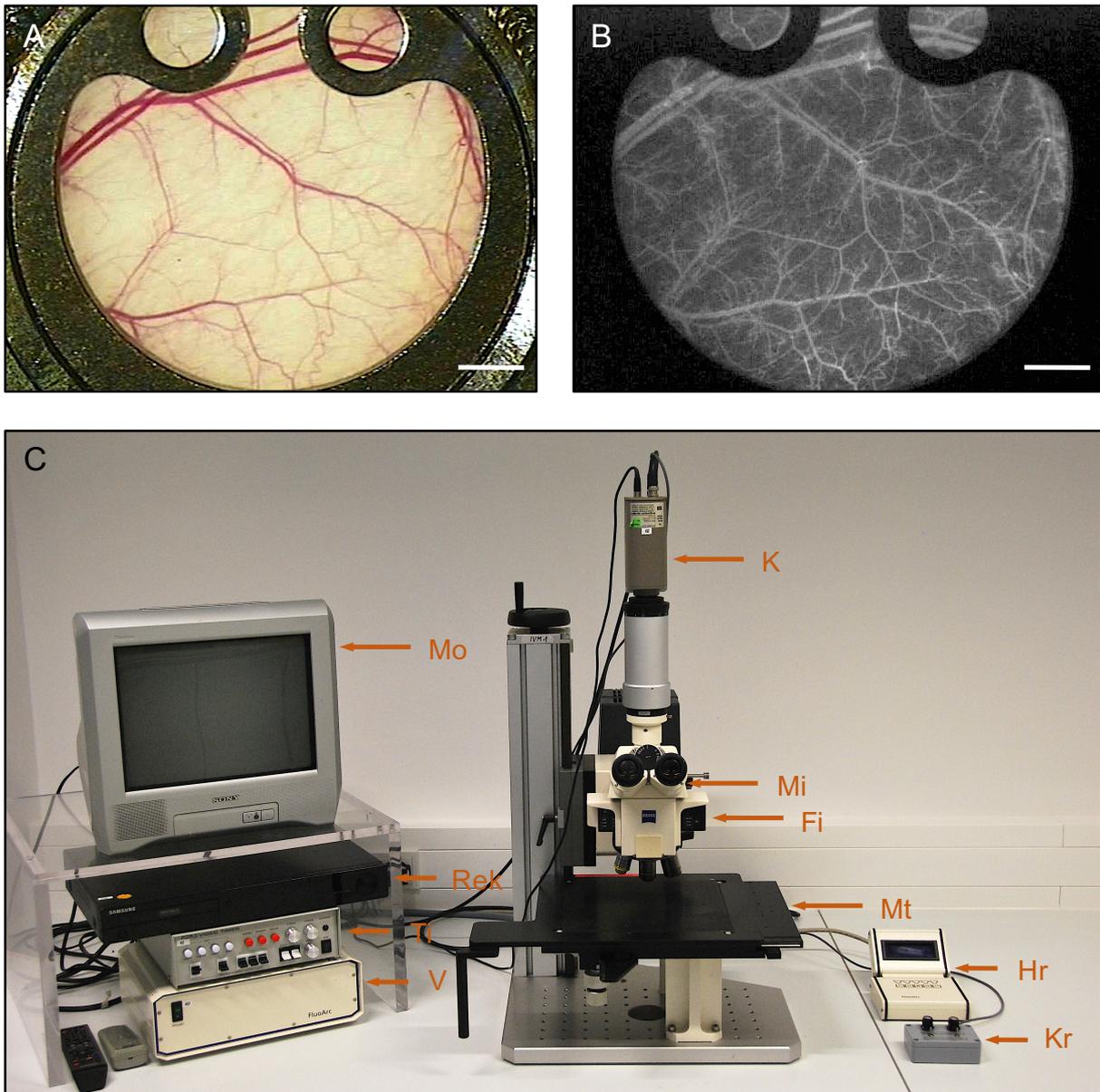


Abbildung 8: A, B: Übersichtsaufnahme einer Rückenhautkammer mittels Stereo-Mikroskopie vor Kontrastmittelgabe (A) und mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie nach retrobulbärer Injektion von 0,1 ml FITC-markiertem Dextran (B). Maßstab: 1,5 mm. C: Arbeitsplatz zur Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Monitor (Mo), DVD-Rekorder (Rek), Videotimer (Ti), Vorschaltgerät (V), Kamera (K), Mikroskop (Mi), Filterblock (Fi), Mikroskopiertisch (Mt), Helligkeitsregler (Hr), Kameraregler (Kr).

Die intravitale Mikroskopie (Abbildung 8C) wurde mittels eines modifizierten Zeiss Axiotech Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, welches mit einer 100 Watt Quecksilberdampfampe und einem zwischengeschalteten Filterblock ausgestattet war. Dieser Block ermöglichte durch Zuschaltung drei verschiedener Filter die Anregung des Untersuchungsfeldes mit Licht der Wellenlänge von 330-390 nm (ultraviolett), 450-490 nm (blau) und 530-560 nm

(grün). Das emittierte Licht wurde bei >430 nm (ultraviolett), >520 nm (blau) und >580 nm (grün) gefiltert.

Zur offline-Analyse wurden die mikroskopischen Bilder mit einer Charge-Coupled Device (CCD)-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) auf einen Rekorder (DVD-HR775; Samsung Electronics, Seoul, Südkorea) übertragen und auf DVD gespeichert. Durch einen 14-Zoll Videomonitor (Trinitron; Sony, Tokio, Japan) erfolgte zeitgleich die direkte Visualisierung der mikroskopischen Bilder. Dabei konnten mit einem 5x, 10x und 20x Objektiv (Zeiss) mit langem Arbeitsabstand Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf dem Monitor erzielt werden. Die Zuordnung der Aufnahmen zur entsprechenden Versuchstiernummer erfolgte mithilfe eines Videotimers (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan), der eine Beschriftung der Videosequenzen erlaubte.

5.6.1. Mikrozirkulatorische Analysen

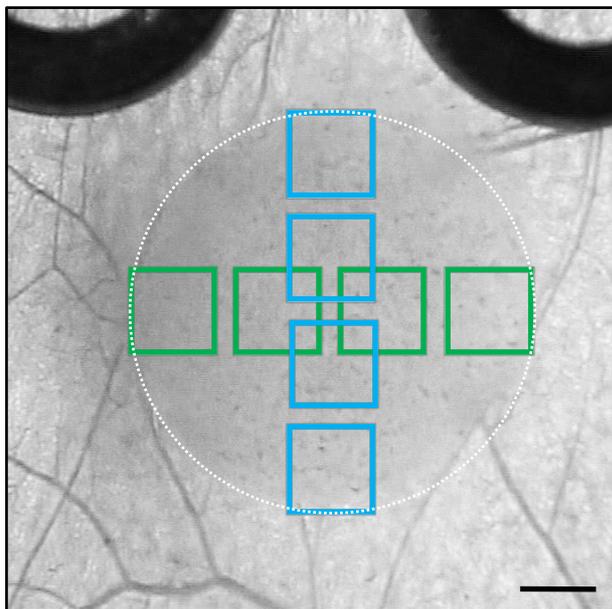


Abbildung 9: Position der 8 verschiedenen ROIs in horizontaler (grün) und vertikaler (blau) Richtung in einem Integra®-Scaffold (Ränder mit gepunkteter Linie markiert). Maßstab: 0,5 mm.

Das über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen aufgenommene Bildmaterial konnte zu einem beliebigen Zeitpunkt abgespielt und mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) computer-assistiert ausgewertet werden. Die Analyse erfolgte an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation der prä-vaskularisierten Scaffolds. Dazu wurden 8 vorher definierte Felder (Abbildung 9; Regions of Interest (ROIs)) mit einer Größe von $0,4 \text{ mm}^2$

im Randbereich sowie im Zentrum der Implantate mit dem 20x Objektiv aufgenommen. Diese Einteilung erfolgte für die Implantate aller Versuchstiere an jedem Untersuchungstag identisch, um die Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu

gewährleisten. In diesen ROIs wurden folgende Parameter erfasst: Perfundierte ROIs (5.6.1.1.), funktionelle Kapillardichte (5.6.1.2.), Gefäßdurchmesser (5.6.1.3.), Blutzellgeschwindigkeit (5.6.1.4.), mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (5.6.1.5.) und Scherrate (5.6.1.6.).

5.6.1.1. Perfundierte ROIs

Durch die Auszählung aller perfundierten ROIs konnten erste Rückschlüsse auf die Angiogenese und Vaskularisierung der Implantate gezogen werden. ROIs wurden als perfundiert definiert, wenn sie am Beobachtungstag mindestens ein durchblutetes Gefäß aufwiesen. Dabei konnten die Gefäße entweder GFP-negativ und damit aus dem Empfängergewebe neu in die Implantate eingewachsen sein oder GFP-positiv und damit reperfundierte mikrovaskuläre Fragmente sein. Der Anteil der perfundierten ROIs wurde in Prozent aller analysierten ROIs angegeben.

5.6.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Zusätzlich zu den perfundierten ROIs wurde die funktionelle Kapillardichte gemessen. Diese ist definiert als die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße pro Fläche des Beobachtungsfelds. Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurde jedes Beobachtungsfeld nachträglich im Standbild analysiert. Mithilfe des Analyseprogrammes CapImage (Dr. Zeintl) wurden alle durchbluteten, Kontrastmittel-positiven Gefäße der Länge nach markiert. Anschließend wurde die funktionelle Kapillardichte als Quotient aus der Gesamtlänge der perfundierten Gefäße und der Fläche des Beobachtungsfeldes errechnet und in cm/cm^2 angegeben.

5.6.1.3. Gefäßdurchmesser

Durch die Markierung des Blutplasmas mittels FITC-Dextran konnten perfundierte Gefäße klar vom unmarkierten Hintergrund abgegrenzt werden. Pro ROI wurden an

jedem Untersuchungszeitpunkt der Durchmesser (d) von fünf verschiedenen Gefäßen bestimmt. Zur Standardisierung wurden nur die Gefäße gemessen, welche die horizontalen oder vertikalen Mittellinien des Beobachtungsfelds schnitten. Zur Messung des Gefäßdurchmessers wurden im Videostandbild zwei gegenüberliegende Randpunkte eines Gefäßes miteinander verbunden. So konnte eine senkrecht zur Gefäßinnenwand liegende Strecke eingezeichnet werden. Diese Verbindungslinie wurde in ihrer Länge in μm bestimmt.

5.6.1.4. Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit (v) wurde an den identischen fünf Gefäßen gemessen, an denen zuvor der Durchmesser bestimmt worden war. Die Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte durch die Computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode [KLYSCZ et al., 1997]. Hierzu wurde eine zentrale Messlinie in das Gefäßlumen eingezeichnet, die entlang des Blutstroms ausgerichtet war (*Abbildung 10A*).

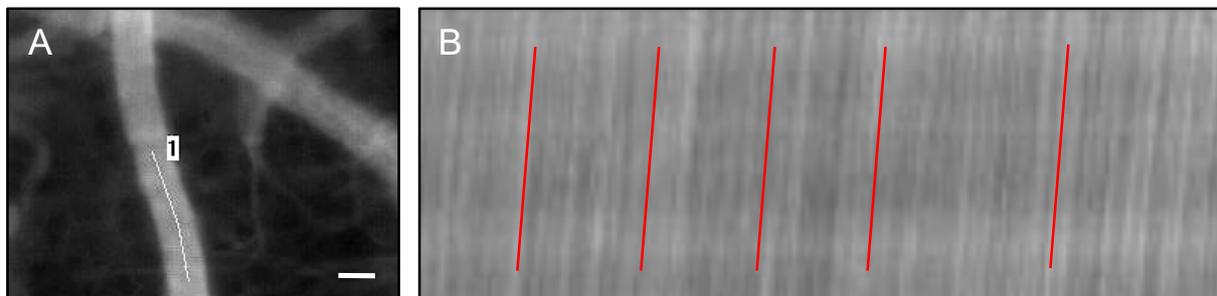


Abbildung 10: **A:** Messung der Blutzellgeschwindigkeit in einem Kontrastmittel-markierten Gefäß entlang einer zentralen Messlinie (weiß). Maßstab: $20\ \mu\text{m}$. **B:** Aus A resultierendes Line-Shift-Diagramm mit hellen und dunklen Linien. Über den Mittelwert der Steigungen der eingezeichneten Messlinien (rot) erfolgt die Berechnung der Blutzellgeschwindigkeit.

Im Anschluss daran wurde die DVD für etwa zehn Sekunden in Echtzeit abgespielt. In diesem Zeitintervall wurde jedes Halbbild entlang der Messlinie einem Grauwert zugeordnet und in einem separaten Bildspeicher aufgezeichnet. Das aneinandergereihte Grauwertprofil wurde vom Computerprogramm als Line-Shift-Diagramm wiedergegeben (*Abbildung 10B*). Dieses bestand aus schrägen Linien mit verschiedenen Grautönen. Während dunklere Linien die Bewegung einzelner

Erythrozyten entlang der Messlinie im Kontrast zum hell angefärbten Blutplasma anzeigten, entstanden hellere Linien aufgrund von Plasmalücken im Bereich der Messlinie. Aus dem Mittelwert der Steigungen dieser schrägen Linien konnte die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ ermittelt werden.

5.6.1.5. Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss

Das Volumen, das durch ein Gefäß innerhalb eines bestimmten Zeitraums fließt, wird als mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (Q) bezeichnet. Dieser Parameter errechnet sich durch Multiplikation des Querschnittes des Blutgefäßes mit der Blutzellgeschwindigkeit. Bei dieser Berechnung wird jedoch außer Acht gelassen, dass das Flussprofil einer linear viskösen Newtonschen Flüssigkeit innerhalb eines röhrenförmigen Gebildes nicht an jedem Punkt des Querschnittes konstant ist (*Abbildung 11A*), sondern ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aufweist [BAKER & WAYLAND, 1974].

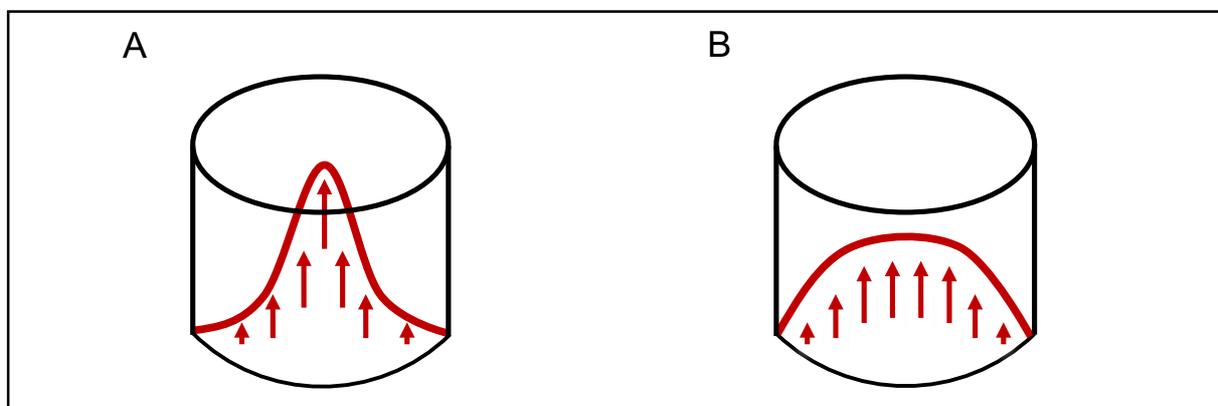


Abbildung 11: **A:** Parabolisches Flussprofil einer Newtonschen Flüssigkeit innerhalb eines röhrenförmigen Gebildes. **B:** Abgeflachtes Flussprofil einer nicht-Newtonschen Flüssigkeit wie Blut unter identischen Bedingungen wie in A.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Blutzellgeschwindigkeit jedoch ausschließlich im Gefäßzentrum gemessen, weshalb die Berechnung des mikrovaskulären volumetrischen Blutflusses mittels eines Faktors korrigiert werden musste, um den mikrovaskulären Blutfluss nicht zu überschätzen. Da Blut aufgrund seiner korpuskulären Bestandteile zusätzlich von dem parabolischen

Geschwindigkeitsprofil einer Newtonschen Flüssigkeit abweicht (*Abbildung 11B*), wurde in der vorliegenden Arbeit hierzu der Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor von 1,6 [BAKER & WAYLAND, 1974] benutzt. Dieser berücksichtigt sowohl das veränderte Strömungsprofil des Blutes als auch die zentrale Messung der Blutflussgeschwindigkeit in Gefäßen über 20 µm. Demnach wurde zur Berechnung des mikrovaskulären volumetrischen Blutflusses Q folgende Formel verwendet:

$$Q = \pi * (d/2)^2 * v/1,6 \text{ [pl/s]}$$

*Q = mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss; d = Durchmesser des Einzelgefäßes;
v = Blutzellgeschwindigkeit*

5.6.1.6. Scherrate

Die genannten Unregelmäßigkeiten des Strömungsprofils von Blut werden durch Reibungskräfte bedingt, die entlang des Gefäßendothels wirken. Diese Scherkräfte können auch stimulierend auf das Gefäßwachstum wirken [GALIE et al., 2014]. Ein Maß für die Scherkräfte, die bei diesem Vorgang auf die einzelnen Zellen im Gefäß einwirken, ist die Scherrate (γ). In der vorliegenden Arbeit basierte deren Berechnung auf der Newtonschen Definition:

$$\gamma = 8 * v/d$$

\gamma = Scherrate; v = Blutzellgeschwindigkeit; d = Durchmesser des Einzelgefäßes

5.6.2. Abschluss der *in vivo* Untersuchungen

Nach Abschluss der letzten intravitalmikroskopischen Aufnahmen an Tag 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds wurden die Versuchstiere mittels einer Überdosis Anästhetikum euthanasiert. Das Rückenhautkammerngewebe einschließlich der Implantate wurde anschließend für nachfolgende Analysen sorgfältig exzidiert.

Darüber hinaus erfolgte in den Versuchsgruppen des zweiten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit eine mediane Laparotomie der

narkotisierten Versuchstiere und die Darstellung der *Vena cava inferior*. Aus dieser wurden mithilfe einer 1 ml Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences) mindestens 0,2 ml Blut zur Bestimmung des EPO-abhängigen Hämatokrit-Werts entnommen [RUTHERFORD et al., 1994]. Die Analyse des Blutes wurde mittels des automatisierten Auswertungssystems VetScan® HM5 (scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland) durchgeführt und ermöglichte die Angabe des Hämatokrits in Prozent.

5.7. Histologie und Immunhistochemie

5.7.1. Histologische Präparate

Das exzidierte Rückenhautkammerngewebe einschließlich der Implantate wurde für nachfolgende histologische sowie immunhistochemische Untersuchungen aufbereitet. Zusätzlich wurden für *in vitro* Untersuchungen prävascularisierte Scaffolds direkt nach ihrer Besiedlung mit mikrovaskulären Fragmenten für immunhistochemische Analysen verwendet. Alle Proben wurden in 4 %-iger Formaldehydlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 Stunden bei 20 °C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Im nächsten Schritt wurden 3 µm dicke Serienschritte hergestellt, die wie nachfolgend beschrieben gefärbt wurden. Die Visualisierung sämtlicher Schnitte erfolgte mit einem BZ-8000 Mikroskopsystem (Keyence).

5.7.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Aus der Rückenhautkammer entnommenes Gewebe wurde zunächst mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Standardprotokoll gefärbt. Durch diese Technik konnten die Implantate, das umgebende Empfängergewebe sowie neu gebildetes Granulationsgewebe identifiziert werden. Entsprechend ließ sich durch diese Färbung die Inkorporation der prävascularisierten Integra®-Scaffolds histomorphologisch beurteilen.

5.7.3. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung

Zur genaueren Analyse der mikrovaskulären Netzwerke innerhalb des exzidierten Rückhautkammergewebes und der Implantate erfolgte eine CD31-GFP-Doppelfluoreszenz-Färbung. Der Endothelzellmarker CD31 markierte dabei alle Blutgefäße. Durch die gleichzeitige Färbung mit einem Antikörper gegen GFP konnte die genaue Herkunft einzelner Gefäße bestimmt werden. Während Gefäße des Empfängergewebes GFP-negativ waren, ließen sich die präformierten GFP-positiven mikrovaskulären Fragmente mit dem Antikörper gegen GFP anfärben. In der vorliegenden Arbeit war bei der CD31-GFP-Doppelfluoreszenz-Färbung das CD31-Signal rot und das GFP-Signal grün.

Zur Färbung wurden ein monoklonaler Ratte-Anti-Maus CD31-Primärantikörper (1:100; dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Markierung endothelialer Zellen genutzt, der von einem Ziege-Anti-Ratte Alexa555-Sekundärantikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) detektiert wurde. Die Schnitte wurden anschließend für eine Stunde in einer Plastikkuvette bei 98 °C mit 0,05 % Citraconsäureanhydrid-Puffer (pH 7,4; Sigma-Aldrich) gekocht und dann bei Raumtemperatur abgekühlt. Über Nacht fand bei 4 °C die Inkubation mit einem polyklonalen Ziege-Anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland) als zweiter Primärantikörper statt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad (GFL 1083; GFL, Burgwedel, Deutschland) mit einem Biotin-markierten Esel-Anti-Ziege Sekundärantikörper (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) markiert. Dieser wurde durch Alexa488-markiertes Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) detektiert, welches grün leuchtet. Zur genauen Zuordnung bei der digitalen Überlagerung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarben wurden die Zellkerne zusätzlich mittels Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) blau gefärbt.

Die Gesamtzahl der CD31-positiven Gefäße innerhalb der Implantate sowie in deren unmittelbarem Randbereich wurde bestimmt und pro Fläche (mm⁻²) angegeben. Darüber hinaus wurde der Anteil der GFP-positiven Gefäße innerhalb der Implantate und in ihrem Randbereich ermittelt. Dabei wurde pro Implantat jeweils ein repräsentativer Schnitt ausgewertet (n = 9 pro Gruppe im ersten Studienabschnitt; n = 8 pro Gruppe im zweiten Studienabschnitt).

5.7.4. CD31-Caspase (Casp)-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung

Um im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit den Einfluss von EPO auf mikrovaskuläre Fragmente zu untersuchen, wurden Integra[®]-Scaffolds, die mit EPO- bzw. Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten beladen worden waren, direkt nach ihrer Besiedlung für weitere immunhistochemische Untersuchungen eingebettet. Diese Analysen umfassten die beiden Doppelfluoreszenzfärbungen CD31-Casp-3 und CD31-Ki67.

Die CD31-Casp-3-Doppelfluoreszenzfärbung diente zur Detektion apoptotischer Zellen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente. Casp-3 wird als Effektor-Caspase durch das Auslösen des Apoptose-Zyklus aktiviert. Über mehrere Zwischenschritte führt sie zu einer DNA-Fragmentierung und schließlich zur Apoptose der Zelle [BELL & MEGENEY, 2017]. Die CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung wurde zur Visualisierung des Proliferationsmarkers Ki67 angewendet. Dieses Protein kann in den teilungsaktiven Phasen (G(1), S, G(2) sowie Mitose) des Zellzyklus detektiert werden und erlaubt deshalb Rückschlüsse auf die proliferative Aktivität der Zelle [SCHOLZEN & GERDES, 2000]. In den beiden Doppelfluoreszenzfärbungen wurden in der vorliegenden Arbeit CD31-positive Gefäße grün und das Casp-3- bzw. Ki67-Signal rot gefärbt.

Als Primärantikörper wurde für diese Färbung ein monoklonaler Ratte-Anti-Maus Antikörper gegen CD31 (1:100; dianova GmbH) angewendet, mit dem die entsprechenden Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper gegen Casp-3 bzw. Ki67, einem polyklonalen Kaninchen-Casp-3-Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) bzw. einem polyklonalen Kaninchen-anti-Ki67-Antikörper (1:500; Abcam). Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Sekundärantikörper. Ein Ziege-Anti-Ratte Alexa488-Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH) diente als Sekundärantikörper zur Detektion des CD31-Signals. Ein Biotin-markierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (nutzfertig; Abcam) wurde für die Bindung des Casp-3- bzw. Ki67-Primärantikörpers genutzt. Die Detektion des Biotin-markierten Antikörpers wurde mittels Alexa555-markiertem Streptavidin (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) durchgeführt. Mittels Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) erfolgte die Kernfärbung in blau.

Im Rahmen des zweiten Studienabschnitts wurde der Anteil Casp-3- sowie

Ki67-positiver Zellen innerhalb mikrovaskulärer Fragmente quantitativ analysiert und in Prozent angegeben. Durch den Endothelzellmarker CD31 konnte dabei zwischen CD31-positiven Endothelzellen und CD31-negativen perivaskulären Zellen unterschieden werden. Pro Experiment wurden für jede Färbung mindestens 100 endotheliale und perivaskuläre Zellen ausgewertet.

5.8. Experimentelles Protokoll

5.8.1. *In vitro* Versuchsgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden für sämtliche *in vitro* Analysen mikrovaskuläre Fragmente zunächst aus dem Fettgewebe von C57BL/6 Spendermäusen isoliert, die entsprechend den beiden Studienabschnitten in eine Behandlungs- oder Kontrollgruppe eingeteilt wurden.

Im ersten Studienabschnitt wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem Fettgewebe von 33 C57BL/6 Mäusen isoliert. Die eine Hälfte der mikrovaskulären Fragmente wurde für 7 d kryokonserviert, während die andere Hälfte frisch isoliert als Kontrolle diente. Die mikrovaskulären Fragmente wurden hinsichtlich der Anzahl (n = 3 unabhängige Experimente), der Länge (n = 3 unabhängige Experimente), der zellulären Zusammensetzung (n = 4 unabhängige Experimente), der Viabilität (n = 4 unabhängige Experimente), der Proteinexpression (n = 2 Wiederholungen) und der Sekretion von Wachstumsfaktoren (n = 6 Wiederholungen) untersucht. Darüber hinaus wurde die Oberflächenmorphologie von besiedelten Integra[®]-Scaffolds analysiert (n = 4 unabhängige Experimente).

Im zweiten Studienabschnitt erfolgte die Isolierung von mikrovaskulären Fragmenten aus dem epididymalen Fettgewebe von 18 C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden zu gleichen Teilen entweder für 24 h in EPO-supplementiertem oder Vehikel-supplementiertem Medium inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression der mikrovaskulären Fragmente untersucht (n = 2 Wiederholungen). Darüber hinaus wurden mikrovaskuläre Fragmente auf Integra[®]-Scaffolds gesiedelt und direkt für die immunhistochemische Analyse der Viabilität und Proliferation genutzt (n = 4 unabhängige Experimente).

5.8.2. *In vivo* Versuchsgruppen

Für die *in vivo* Analysen wurden **in beiden Studienabschnitten** mikrovaskuläre Fragmente aus dem Fettgewebe von insgesamt 17 transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Spendermäusen isoliert. Erneut wurde eine Hälfte der mikrovaskulären Fragmente eines Tieres je nach Studienabschnitt als Behandlungsgruppe kryokonserviert bzw. einer EPO-Behandlung unterzogen, während die andere Hälfte frisch isoliert bzw. nach Vehikel-Behandlung als Kontrolle diente. Die mikrovaskulären Fragmente der Versuchsgruppen wurden jeweils auf Integra[®]-Scaffolds gesiedelt. Die prävascularisierten Scaffolds wurden anschließend in die Rückenhautkammer von insgesamt 34 C57BL/6 Wildtyp Mäusen implantiert (n = 9 pro Gruppe im ersten Studienabschnitt; n = 8 pro Gruppe im zweiten Studienabschnitt).

In der vorliegenden Arbeit wurden vier tierexperimentelle *in vivo* Versuchsgruppen analysiert, die sich auf zwei Studienabschnitte verteilten. In beiden Studienabschnitten wurden Integra[®]-Scaffolds mit unterschiedlich behandelten, GFP-positiven mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Anschließend erfolgte die Implantation der prävascularisierten Integra[®]-Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Studienabschnitt I: Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

- Gruppe 1 (Kontrolle): frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente (n = 9)
Gruppe 2: kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente (n = 9)

Studienabschnitt II: EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

- Gruppe 1 (Kontrolle): Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (n = 8)
Gruppe 2: EPO-behandelte mikrovaskuläre Fragmente (n = 8)

5.8.3. Versuchsablauf

Die Kammerpräparation der Versuchstiere wurde sorgfältig in Narkose durchgeführt und die präparierte Rückenhautkammer stereo-mikroskopisch überprüft. Den Tieren

wurde ein Zeitraum von 48 Stunden vor weiteren Eingriffen gewährt. Anschließend erfolgte die Implantation der Scaffolds und die erste Intravitalmikroskopie. Vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Visualisierung des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer in 25-facher Vergrößerung mittels eines Stereo-Operationsmikroskops, um Entzündungen auszuschließen. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde sowohl am Tag der Implantation als auch am 3., 6., 10. und 14. Tag durchgeführt. Nach Abschluss der mikroskopischen Untersuchung an Tag 14 wurden die Versuchstiere mittels einer Überdosis des Anästhetikums euthanasiert und das Rückenhautkammerngewebe einschließlich der Implantate für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen exzidiert. Darüber hinaus erfolgte im Rahmen des zweiten Studienabschnitts die Abnahme von venösem Blut der Tiere zur Hämatokrit-Bestimmung.

5.9. Statistik

Für sämtliche erhobenen Daten erfolgte zunächst die Überprüfung auf Normalverteilung der Werte. Anschließend konnten die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mittels des ungepaarten Student's t-Test auf statistische Signifikanz überprüft werden. Bei nicht normalverteilten Daten wurde stattdessen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ($x \pm \text{SEM}$) angegeben. Die einzelnen Messwerte eines Versuchstieres zu einem Zeitpunkt bildeten einen Mittelwert, wobei aus den Mittelwerten der Tiere innerhalb einer Gruppe ein Gesamtmittelwert errechnet wurde. Für sämtliche statistischen Analysen wurde das Softwarepaket Prism (Version Prism 7.0a; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) genutzt. Ein p-Wert $< 0,05$ definierte Unterschiede als statistisch signifikant und wurde dementsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Der Einfluss einer Kryokonservierung bzw. EPO-Behandlung auf die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente wurde im ersten und zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit am Modell der Rückenhautkammer analysiert. Das Gewebe der Kammer und der darin befindlichen Implantate wurde mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen visualisiert (*Abbildung 12*). Zur Darstellung der Mikrozirkulation diente dabei der Plasma-Marker FITC-Dextran (5 %), der aufgrund seines hohen Molekulargewichts von 150.000 Da unter physiologischen Bedingungen eine nur geringe Extravasation aufweist.

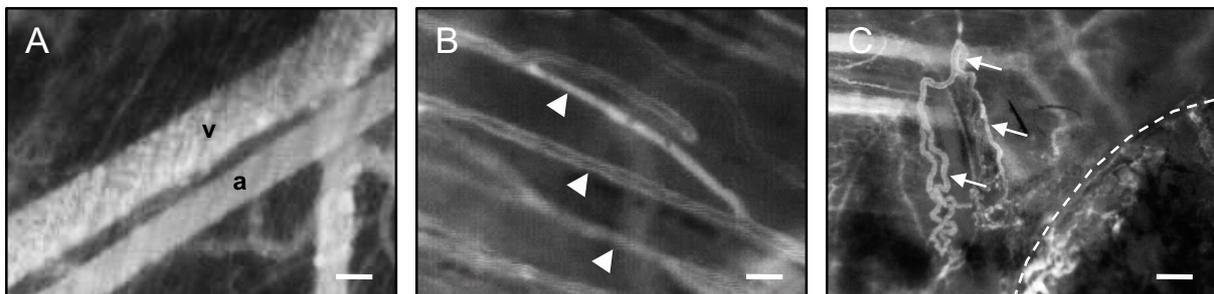


Abbildung 12: Intravitalmikroskopische Aufnahmen verschiedener Gefäßabschnitte in der Rückenhautkammer nach Applikation von 0,1 ml FITC-Dextran. **A:** Unterschiedliche Durchmesser einer Arteriole (a) und einer Venole (v). **B:** Typische parallele Anordnung der Muskelkapillaren innerhalb des Rückenhautgewebes (Pfeilspitzen). **C:** Wachstum neuer, perfundierter Gefäße (Pfeile) aus dem Empfängergewebe in Richtung eines implantierten Integra®-Scaffolds (Rand mit unterbrochener Linie markiert). Maßstab: A: 70 μm ; B: 20 μm ; C: 170 μm .

Das Gefäßsystem des Gewebes innerhalb der Rückenhautkammer besteht aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen (*Abbildung 12A und B*). Die verschiedenen Abschnitte des Gefäßsystems weisen unterschiedliche Merkmale auf. Arteriolen ($d = 40\text{-}60 \mu\text{m}$) haben einen geradlinigen Verlauf, eine glatte Wandstruktur sowie eine hohe Fließgeschwindigkeit. Sie verzweigen sich ein- bis zweimal in kleinere Arteriolen ($d = 20\text{-}40 \mu\text{m}$), die ihrerseits das Kapillarbett mit oxygeniertem Blut versorgen. Die Kapillaren sind in einem Abstand von $40\text{-}60 \mu\text{m}$ parallel zueinander angeordnet

(Abbildung 12B) und teilweise durch Quervernetzungen miteinander verbunden. Nach dem Sauerstoffaustausch münden die Kapillaren in postkapillare Venolen ($d = 20-40 \mu\text{m}$), die ihrerseits das Blut in Sammelvenolen ($d = 40-120 \mu\text{m}$) drainieren. Venolen sind intravitalmikroskopisch aufgrund ihrer Flussrichtung, einer unregelmäßigen Wandstruktur und einer langsameren Fließgeschwindigkeit von Arteriolen zu unterscheiden.

Nach der Implantation eines prävaskularisierten Gewebekonstruktes veränderte sich die Mikroarchitektur des Kammergewebes. Im Gefäßbett um das Implantat bildeten sich Gefäßsprossen aus, die auf das Implantat zuwuchsen und mit diesem ein neues mikrovaskuläres Gefäßnetzwerk ausbildeten (Abbildung 12C).

6.2. Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

6.2.1. *In vitro* Analysen

6.2.1.1. Anzahl und Längenverteilung

Bei einer durchschnittlichen Isolierungsdauer von 1,5 h konnten aus einem der bilateralen epididymalen Fettpolster eines Spendertieres etwa $46,000 \pm 4,800$ mikrovaskuläre Fragmente isoliert werden. Wurde zusätzlich zur Isolierung anschließend eine Kryokonservierung durchgeführt, wurden danach nur noch $29,000 \pm 3,700$ und damit 37 % weniger mikrovaskuläre Fragmente mikroskopisch gezählt. In der Suspension, welche die kryokonservierten Fragmente enthielt, konnten außerdem deutlich weniger Einzelzellen detektiert werden. Die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente war hingegen in beiden Versuchsgruppen vergleichbar (Abbildung 13A und B).

Zusätzlich wurden die Längen der kryokonservierten und frisch isolierten mikrovaskulären Fragmente miteinander verglichen (Abbildung 13C). Hierzu wurde der prozentuale Anteil von mikrovaskulären Fragmenten in aufeinanderfolgenden Längenintervallen von $10 \mu\text{m}$ ermittelt. Dabei wiesen die meisten Fragmente in beiden Versuchsgruppen eine Länge zwischen $21-50 \mu\text{m}$ auf. Weiterhin wurde eine vergleichbare Verteilung der mikrovaskulären Fragmente auf die verschiedenen

Längenintervalle gefunden. Entsprechend lag die durchschnittliche Gefäßlänge in beiden Gruppen zwischen 54-58 μm . Hierbei ist zu beachten, dass in beiden Gruppen zwar mit zunehmender Fragmentlänge eine geringere Anzahl von mikrovaskulären Fragmente nachgewiesen wurde, aber jeweils vereinzelt auch sehr große Fragmente mit einer Länge von über 170 μm gefunden wurden (*Abbildung 13C*). Die Kryokonservierung reduzierte somit zwar die Gesamtanzahl der verfügbaren mikrovaskulären Fragmente, beeinflusste jedoch nicht ihre Morphologie oder Länge.

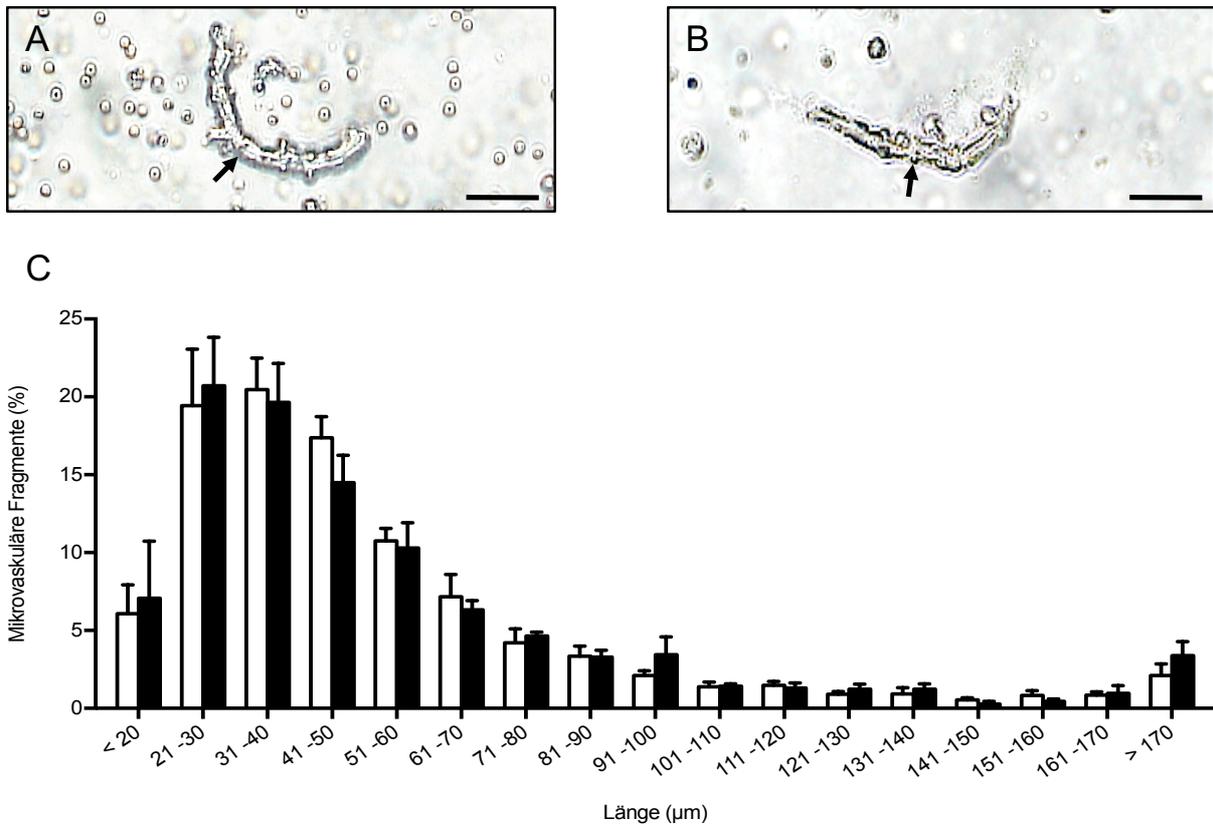


Abbildung 13: A, B: Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines frisch isolierten mikrovaskulären Fragments (A, Pfeil) und eines mikrovaskulären Fragments nach Kryokonservierung (B, Pfeil). Maßstab: 50 μm . C: Längenverteilung von frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (% Kontrolle, weiße Balken; $n = 3$) und von mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (% schwarze Balken; $n = 3$). Mittelwert \pm SEM.

6.2.1.2. Zelluläre Zusammensetzung

Die durchflusszytometrische Untersuchung der frisch isolierten sowie kryokonservierten mikrovaskulären Fragmente zeigte keine signifikanten Unterschiede ihrer zellulären Zusammensetzung (Tabelle 1). Beide Gruppen enthielten jeweils 29-34 % CD31-positive Endothelzellen. Außerdem konnten in beiden Versuchsgruppen Zellen detektiert werden, welche die Stroma- bzw. Stammzellmarker CD13, CD73 sowie CD117 aufwiesen. Darüber hinaus wurden auch Zellen mit der Markerkombination Sca-1/VEGFR-2, die zum Nachweis endothelialer Progenitorzellen benutzt wird, detektiert.

	CD31	CD13	CD73	CD117	Sca-1/VEGFR-2
Kontrolle	34,2 ± 2,4	34,7 ± 2,0	50,6 ± 0,9	2,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5
Kryo	29,3 ± 3,8	40,6 ± 1,9	53,5 ± 1,2	2,7 ± 0,3	2,8 ± 0,6

Tabelle 1: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker (% aller Zellen) auf Zellen von frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (Kontrolle; n = 4) und von mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (Kryo; n = 4). Mittelwert ± SEM.

6.2.1.3. Viabilität

Durch Färbung der mikrovaskulären Fragmente mit Hoechst 33342 sowie Propidiumiodid und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung konnte eine Rate von ~ 2 % Propidiumiodid-positiven, nekrotischen Zellen in frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Diese Rate war in den mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung signifikant auf 11 % erhöht (Abbildung 14B und C).

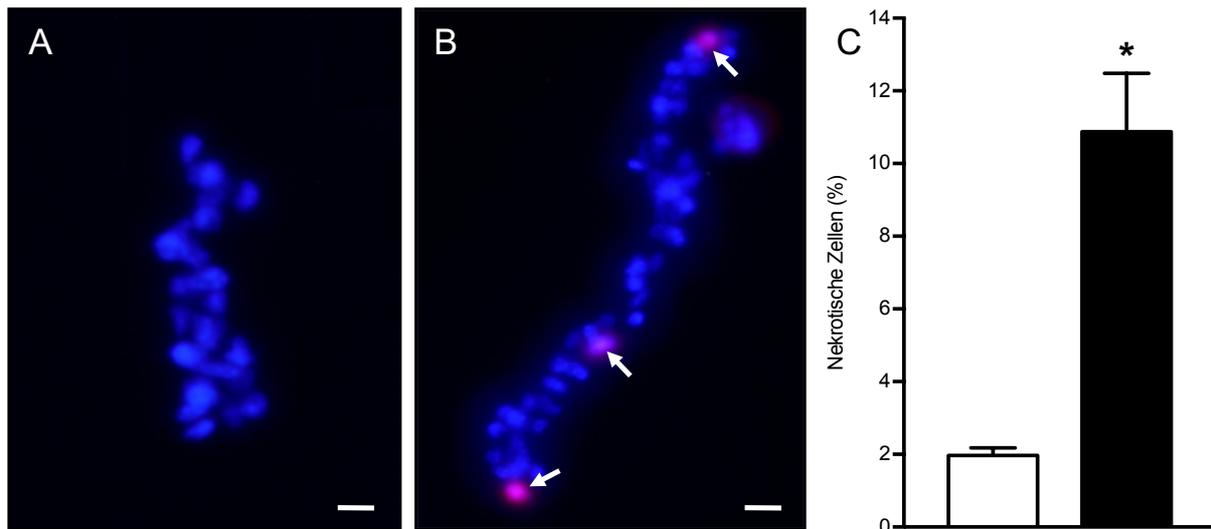


Abbildung 14: **A, B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines frisch isolierten mikrovaskulären Fragments (A) und eines mikrovaskulären Fragments nach Kryokonservierung (B). Die mikrovaskulären Fragmente wurden mittels Hoechst 33342 (blau) zur Detektion der Zellkerne und Propidiumiodid (rot, Pfeile) zur Visualisierung nekrotischer Zellen angefärbt. Maßstab: 17 μm . **C:** Nekrotische Zellen (%) innerhalb frisch isolierter mikrovaskulärer Fragmente (Kontrolle, weißer Balken; $n = 4$) und mikrovaskulärer Fragmente nach Kryokonservierung (schwarzer Balken; $n = 4$). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

6.2.1.4. Proteinexpression

Die angiogene Aktivität der mikrovaskulären Fragmente wurde durch ein Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Array untersucht. Mit dieser Methode wurden 53 Proteine, die Einfluss auf angiogene Signalkaskaden haben, analysiert. Frisch isolierte und kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente wurden miteinander verglichen. Mithilfe des Arrays konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der analysierten Proteine durch die Kryokonservierung hochreguliert wurde (*Tabelle 2*). Bemerkenswerterweise konnten für die pro-angiogenen Faktoren Keratinocyte Chemoattractant (KC), Matrix Metalloproteinase (MMP)-8, Interleukin (IL)-10, Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 und Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)-3 die höchsten Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden (*Tabelle 2*).

Protein	Expression (% der Kontrolle)
KC/CXCL1/CINC-1/GRO-alpha	462,3
MMP-8	282,8
IL-10/CSIF	222,8
MCP-1/CCL2/JE	215,5
IGFBP-3	200,7
MMP-9	199,5
IGFBP-2	186,2
Fractalkine/CX3CL 1	172,5
Serpin F1/PEDF	170,8
PDGF-AA	166,3
TIMP-4	161,0
Angiopoietin-1/Ang-1	157,5
Angiogenin/ANG	155,1
PIGF-2	152,2
IL-1beta	150,9
DLL4	148,8
Platelet Factor 4/CXCL4/PF4	143,7
Endothelin-1/ET-1	137,0
Osteopontin/OPN	135,7
Coagulator Factor III/Tissue Factor/TF	131,3
Endostatin/Collagen VIII	131,1
Proliferin	130,1
IGFBP-1	128,6
HGF	127,7
Serpin E1/PAI-1	124,6
Thrombospondin-2/TSP-2	123,9
VEGF B/VRF	123,8
FGF acid/FGF-1/ECGF/HBGF-1	123,6
Pentraxin-3/PTX3/TSG-14	123,5
Endoglin/CD105	119,4
CXCL 16	116,3
FGF basic/FGF-2	114,1
IP-10/CXCL 10	114,0
GM-CSF	114,0
Angiopoietin-3/Ang-3	113,5
Prolactin/PRL	106,2
PDGF-AB/BB	105,7
IL-1alpha	104,4
TIMP-1	103,9
KGF/FGF-7	102,9
Amphiregulin/AR	102,9
Leptin/OB	102,1
SDF-1/CXCL 12	96,4
VEGF/VPF	92,9
ADAMTS1/METH1	92,4
MMP-3	88,6
DPP IV/CD26	88,2
Cyr61/CCN1, IGFBP-10	82,1
PD-ECGF	74,4
NOV/CCN3/IGFBP-9	74,1
EGF	69,6
MIP-1alpha	66,4
HB-EGF	59,3

Tabelle 2: Expression von 53 Angiogenese-relevanten Proteinen in mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung, die mithilfe eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Arrays bestimmt wurden ($n = 2$ Wiederholungen). Die Werte sind in Prozent der Kontrolle (frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente) angegeben.

6.2.1.5. Sekretion von Wachstumsfaktoren

Mittels ELISA wurde überprüft, ob eine Kryokonservierung die Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren aus mikrovaskulären Fragmenten verändert. Dazu wurden die mikrovaskulären Fragmente beider Versuchsgruppen für 72 h in Medium inkubiert und die in das Medium sezernierten Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF bestimmt (*Abbildung 15*).

Hierbei zeigten kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente eine signifikant erhöhte Ausschüttung der beiden pro-angiogenen Wachstumsfaktoren im Vergleich zu frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten. Die Menge des freigesetzten VEGF durch kryokonservierte Fragmente war mit $3,4 \pm 0,6$ pg/mg mehr als doppelt so hoch als in der Kontrollgruppe mit $1,6 \pm 0,1$ pg/mg (*Abbildung 15A*). Gleichzeitig führte die Kryokonservierung zu einem hohen Level von $101,1 \pm 7,4$ pg/mg bFGF, während in der Kontrollgruppe nur $57,4 \pm 4,5$ pg/mg bFGF gemessen wurden (*Abbildung 15B*).

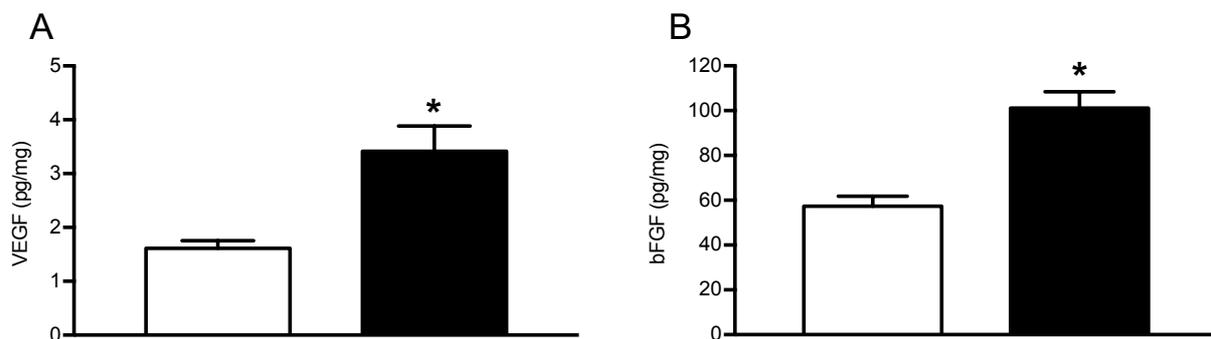


Abbildung 15: Sekretion der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF (A) und bFGF (B) aus frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (Kontrolle, weiße Balken; $n = 6$ Wiederholungen) und mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (schwarze Balken; $n = 6$ Wiederholungen). Die Messung erfolgte mittels ELISA 72 h nach Kultivierung der mikrovaskulären Fragmente. Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

6.2.1.6. Morphologie

Die Auswirkungen einer Kryokonservierung auf die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente wurden mittels REM untersucht (*Abbildung 16*). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die mikrovaskulären Fragmente in den Poren der Integra[®]-Scaffolds (*Abbildung 16A*). Dabei konnten charakteristische

Merkmale der mikrovaskulären Fragmente identifiziert werden. Sie wiesen zahlreiche Endothelzellen auf, welche sich um ein zentrales Lumen gruppierten (*Abbildung 16A*). Außerdem wurden sie auf ihrer Außenseite durch anliegende Perizyten stabilisiert (*Abbildung 16B*).

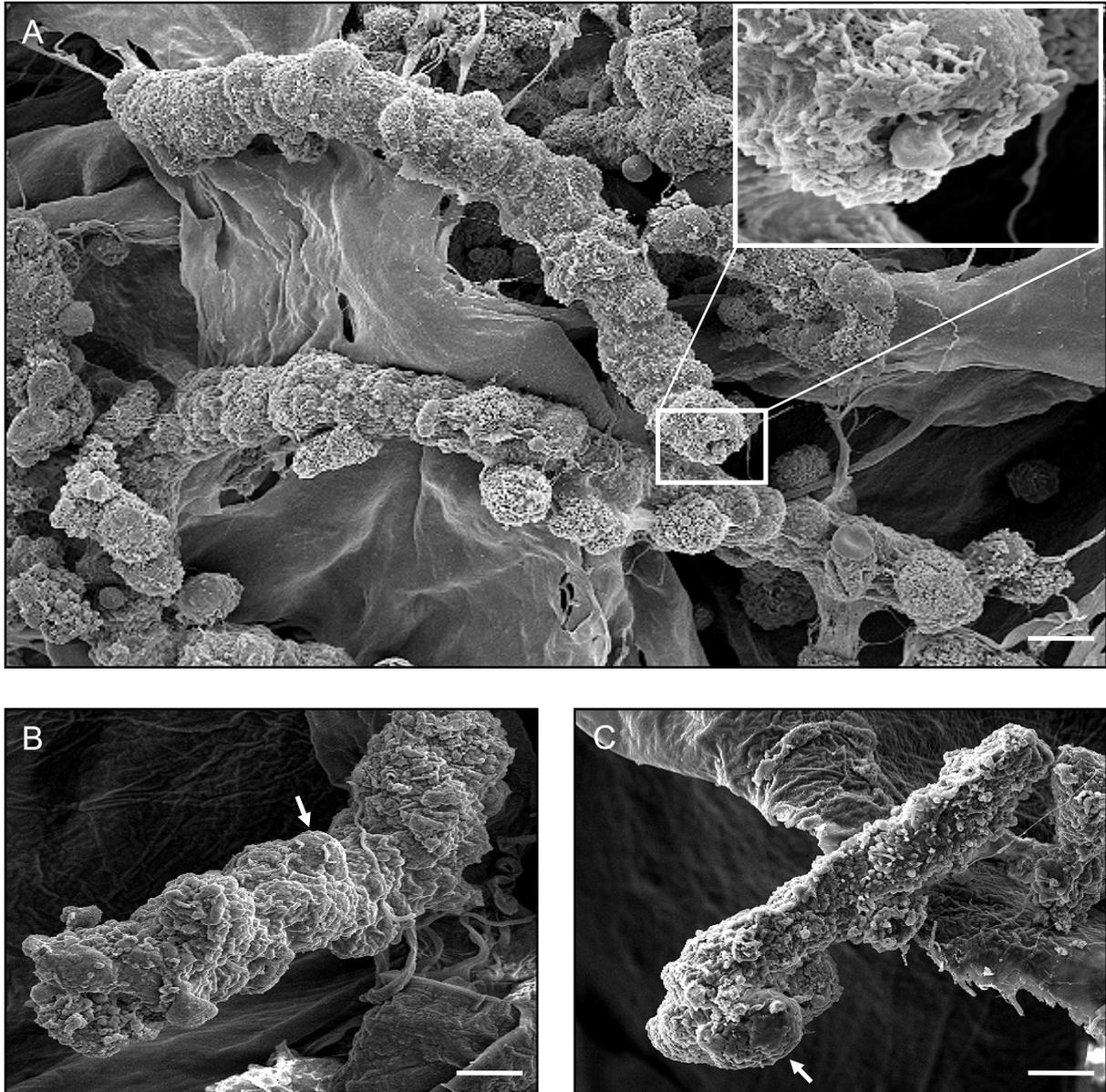


Abbildung 16: REM-Aufnahmen von frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (A, B) und mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (C) auf der Oberfläche von Integra®-Scaffolds. Die mikrovaskulären Fragmente weisen ein zentrales Lumen (höhere Ausschnittsvergrößerung in A) und Wand-stabilisierende Perizyten (B, C; Pfeile) auf. Maßstab: A: 8 μm ; B, C: 6 μm .

Die hochauflösenden REM-Aufnahmen zeigten, dass die Morphologie der mikrovaskulären Fragmente während der Kryokonservierung sowie dem

anschließenden Auftauvorgang erhalten blieb. Entsprechend unterschieden sich die kryokonservierten mikrovaskulären Fragmente rasterelektronenmikroskopisch nicht von den frisch isolierten Fragmenten (*Abbildung 16C*).

6.2.2. *In vivo* Analysen

6.2.2.1. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

Unter Verwendung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, die Vaskularisierung der Fragment-besiedelten Integra[®]-Scaffolds nach Implantation in die Rückenhautkammer zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Spendermäuse zur Isolierung der mikrovaskulären Fragmente benutzt. So konnten die mikrovaskulären Fragmente anhand ihres GFP-Signals auch nach der Besiedlung auf die Trägermatrizes in den Rückenhautkammern der GFP-negativen Empfängertiere detektiert werden (*Abbildung 17*). Übereinstimmend mit den vorausgehenden *in vitro* Untersuchungen wiesen frisch isolierte (*Abbildung 17A und C*) und kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente (*Abbildung 17B und D*) unmittelbar nach ihrer Besiedlung auf die Scaffolds eine vergleichbare Morphologie und Länge auf. Die Gesamtanzahl der kryokonservierten Fragmente war allerdings vermindert.

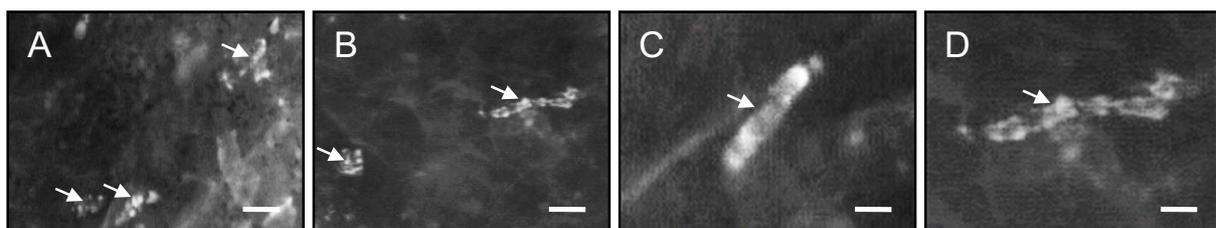


Abbildung 17: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination von GFP-positiven mikrovaskulären Fragmenten (Pfeile), die direkt nach ihrer Isolierung (A, C) oder nach Kryokonservierung (B, D) auf Integra[®]-Scaffolds gesiedelt wurden. Die so prävasikularisierten Scaffolds wurden anschließend in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen implantiert. Maßstab: A, B: 30 µm; C, D: 12 µm.

Im nachfolgenden 14-tägigen Untersuchungszeitraum führten die mikrovaskulären Fragmente beider Versuchsgruppen zu einer vergleichbaren Vaskularisierung der Implantate (*Abbildung 18 und 19*).

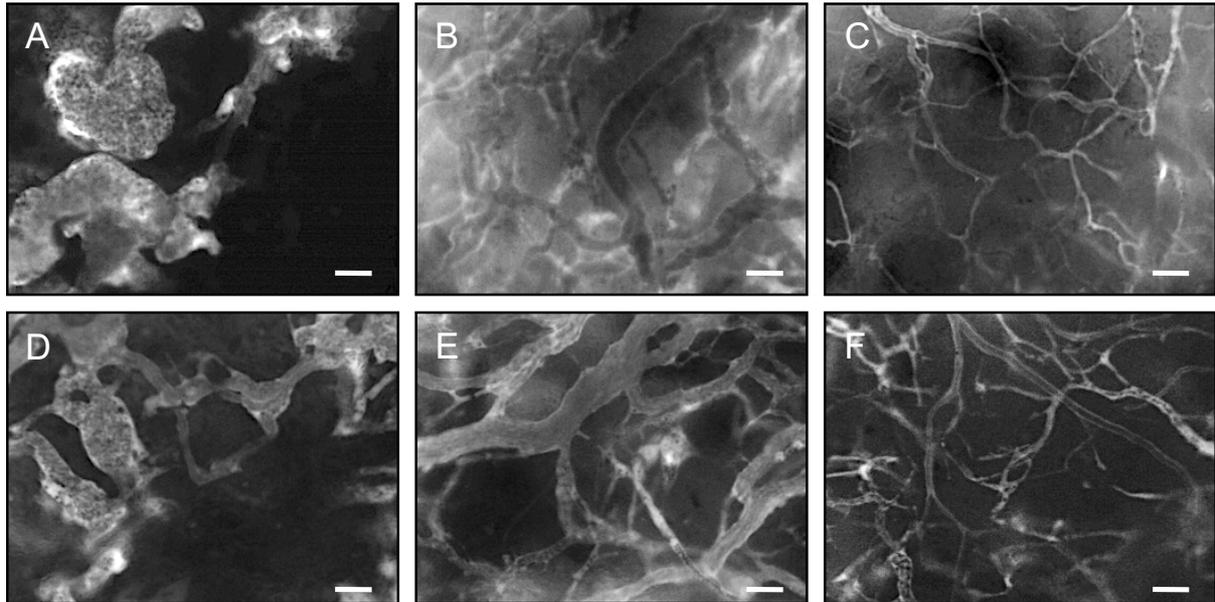


Abbildung 18: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination von Integra®-Scaffolds, die mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (A – C) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (D – F) besiedelt wurden. Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-Dextran 150.000 i.v.. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 6 (A, D), 10 (B, E) und 14 (C, F) nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Maßstab: A, D: 47 µm; B, C, E, F: 64 µm.

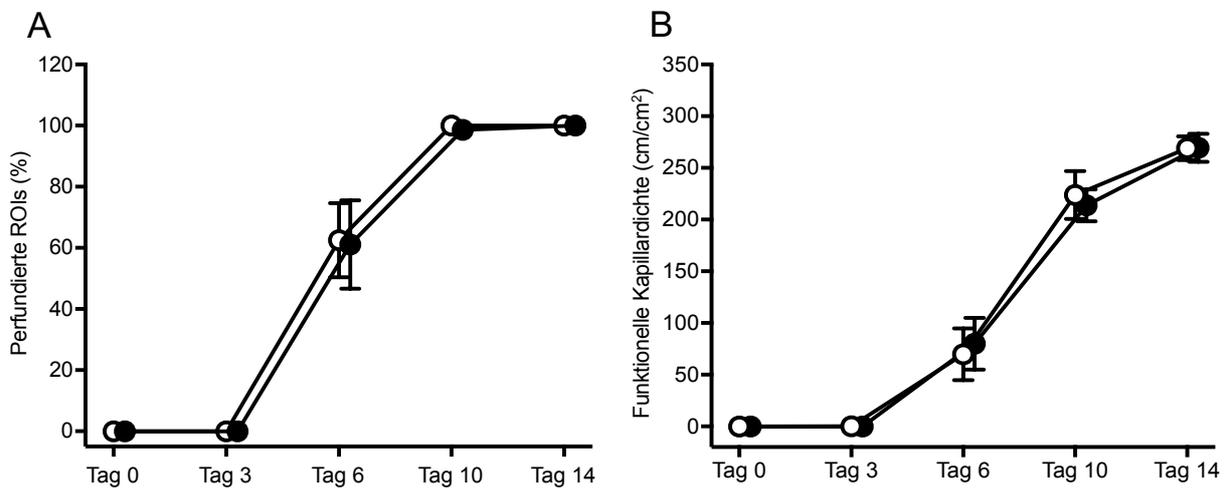


Abbildung 19: Perfundierte ROIs (A; %) und funktionelle Kapillardichte (B; cm/cm²) von Integra®-Scaffolds direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Scaffolds wurden mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (Kontrolle, weiße Kreise; n = 9) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (schwarze Kreise; n = 9) prävascularisiert. Mittelwert ± SEM.

Bis zum 3. Versuchstag wurde keine Perfusion nachgewiesen (*Abbildung 19*). Trotzdem bildeten die mikrovaskulären Fragmente bereits zu diesem Zeitpunkt erste Gefäßknospen und -sprossen aus. Die Sprossen gingen in beiden Gruppen im Laufe des Untersuchungszeitraums mit anderen mikrovaskulären Fragmenten sowie den umliegenden Gefäßen des Empfängergewebes Verbindungen ein. Dies führte zu einem Blut-perfundierten mikrovaskulären Netzwerk in den Poren der Integra®-Scaffolds.

Entsprechend konnten am 6. Tag nach Implantation in beiden Versuchsgruppen erste perfundierte ROIs detektiert werden. In den folgenden Tagen stieg die Anzahl durchbluteter Gefäße rasch an, so dass 100 % der untersuchten ROIs ab dem 10. Tag eine Perfusion aufwiesen (*Abbildung 19A*). Gleichzeitig nahm auch die Dichte der mikrovaskulären Netzwerke konstant zu (*Abbildung 19B*).

6.2.2.2. Mikrohämodynamik

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt im Laufe des zweiwöchigen Beobachtungszeitraums wurden mehrere randomisiert ausgewählte Gefäße innerhalb der Implantate bezüglich Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärem volumetrischem Blutfluss und Scherrate analysiert. Dabei wurden für die genannten Parameter keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen gefunden.

Erste durchblutete und damit zur Untersuchung zur Verfügung stehende Gefäße innerhalb der Integra®-Scaffolds wurden am 6. Tag gefunden. An diesem Tag lag der Gefäßdurchmesser in beiden Gruppen bei 26-28 μm und verringerte sich bis zum Abschluss der Analysen auf 14-16 μm (*Tabelle 3*). Gleichzeitig konnte während des Untersuchungszeitraums ein Anstieg der Blutzellgeschwindigkeit, des mikrovaskulären volumetrischen Blutflusses und der Scherrate ermittelt werden (*Tabelle 3*). Dieser Abfall des Gefäßdurchmessers bei ansteigender Blutzellgeschwindigkeit ist ein typisches Zeichen für die Reifung von Gefäßen [LASCHKE et al., 2014].

	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<i>Durchmesser [μm]:</i>			
Kontrolle	28,1 \pm 2,6	20,6 \pm 2,3	14,5 \pm 0,9
Kryo	26,1 \pm 0,8	18,2 \pm 0,6	15,8 \pm 1,1
<i>Blutzellgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]:</i>			
Kontrolle	64,8 \pm 20,0	234,1 \pm 40,1	298,3 \pm 30,3
Kryo	124,2 \pm 35,4	243,0 \pm 59,0	286,2 \pm 29,5
<i>Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss [$\mu\text{l/s}$]:</i>			
Kontrolle	60,0 \pm 22,3	232,6 \pm 89,2	140,2 \pm 29,9
Kryo	114,0 \pm 32,5	145,0 \pm 45,0	128,6 \pm 19,2
<i>Scherrate [s^{-1}]:</i>			
Kontrolle	24,0 \pm 7,6	117,1 \pm 20,1	208,1 \pm 29,0
Kryo	50,4 \pm 16,3	129,8 \pm 29,5	188,1 \pm 27,1

Tabelle 3: Durchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$), mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss ($\mu\text{l/s}$) und Scherrate (s^{-1}) von durchbluteten Gefäßen innerhalb von Integra®-Scaffolds, die mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (Kontrolle; $n = 9$) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (Kryo; $n = 9$) besiedelt wurden. Die dargestellten Parameter wurden an Tag 6, 10 und 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen erhoben. Mittelwert \pm SEM.

6.2.2.3. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds

Das neugebildete Granulationsgewebe im Bereich der Implantate konnte durch histologische Untersuchungen am 14. Tag näher analysiert werden. Hierbei zeigten HE-gefärbte Schnitte der Implantate beider Versuchsgruppen ein dichtes, vaskularisiertes Granulationsgewebe innerhalb der Poren der Integra®-Scaffolds sowie im anliegenden Empfängergewebe (*Abbildung 20*). Entsprechend konnte eine

gute Inkorporation der prävascularisierten Scaffolds beider Versuchsgruppen innerhalb des Rückenmarksgewebes nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden.

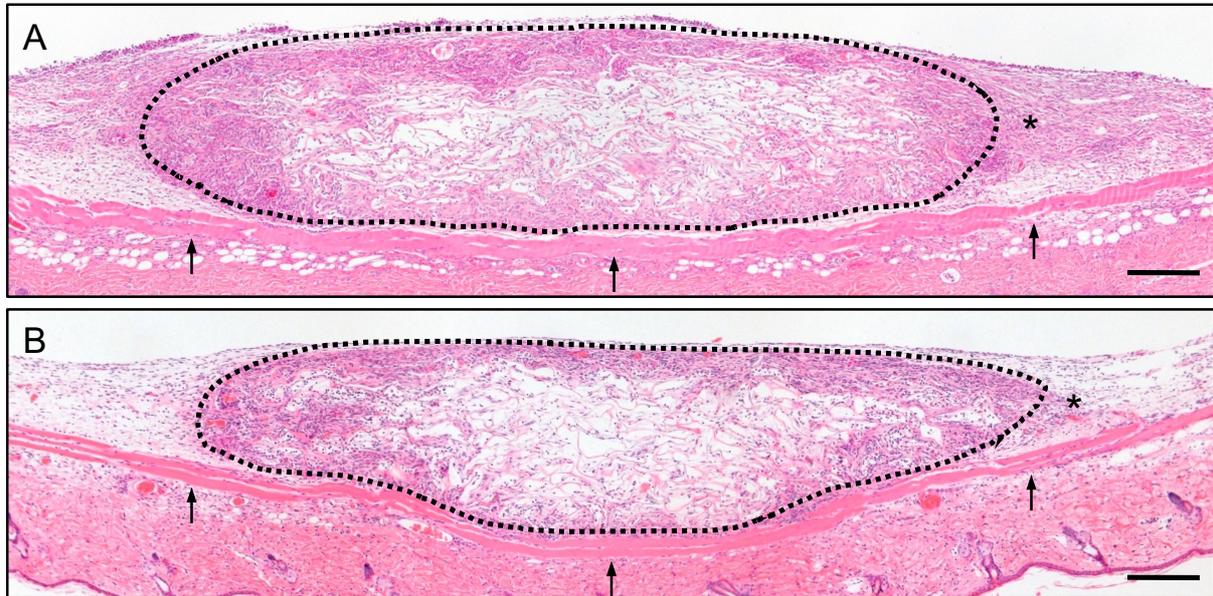


Abbildung 20: HE-gefärbte Schnitte von Integra®-Scaffolds (Ränder mit gepunkteter Linie markiert) am 14. Tag nach Implantation auf den quergestreiften Muskel (Pfeile) der Rückenmarkskammer von C57BL/6 Mäusen. Die Scaffolds wurden mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (A) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (B) besiedelt. Neugebildetes Granulationsgewebe ist sowohl innerhalb der Implantate als auch im angrenzenden Randbereich (Sternchen) zu erkennen. Maßstab: 190 μ m.

Das Granulationsgewebe wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich immunhistochemisch analysiert. Hierbei konnte sowohl im Gewebe innerhalb der Integra®-Scaffolds als auch im angrenzenden Randbereich in beiden Versuchsgruppen eine vergleichbare Dichte CD31-positiver Gefäße gemessen werden (Abbildung 21A, D und 22A). Dieses Ergebnis bestätigt zusammen mit den Resultaten der Intravitalmikroskopie, dass die mikrovaskulären Netzwerke in beiden Gruppen eine vergleichbare Dichte aufwiesen. Darüber hinaus enthielten die Implantate einen Anteil von mehr als 60 % GFP-positiven Gefäße (Abbildung 21). Dies zeigt, dass zahlreiche präformierte GFP-positive mikrovaskuläre Fragmente in den Scaffolds nach Implantation überlebten.

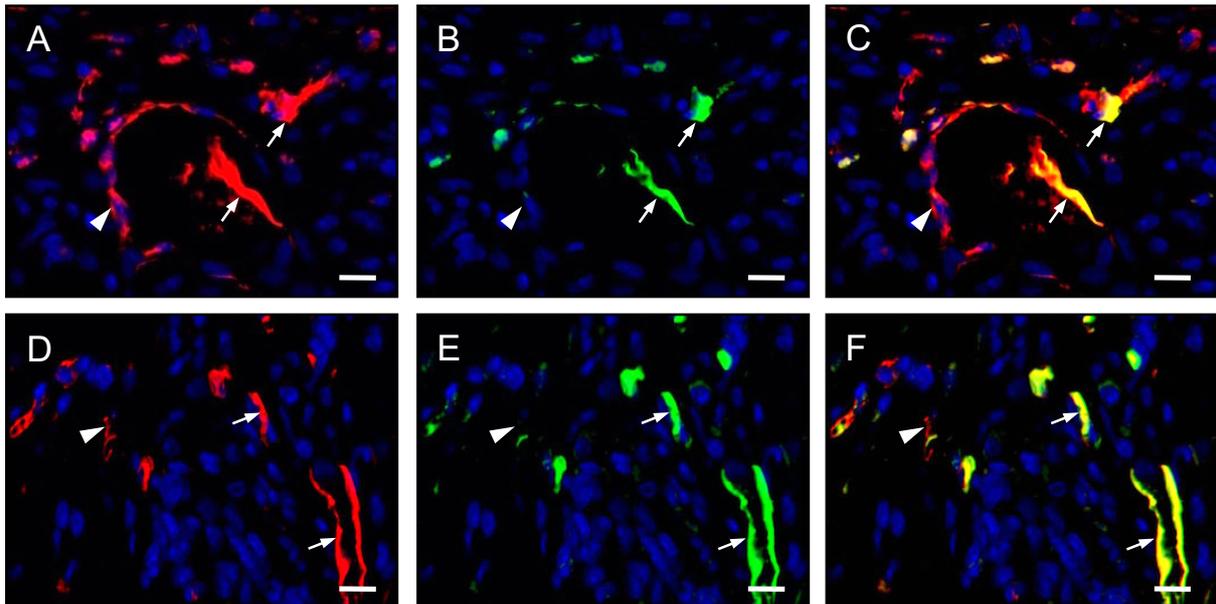


Abbildung 21: A – F: Immunhistochemische Charakterisierung des mikrovaskulären Netzwerks im Zentrum von Integra®-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Scaffolds wurden mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (A - C) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (D - F) besiedelt. Die Schnitte wurden mittels Hoechst 33342 (A - F; blau) zur Detektion der Zellkerne, einem Antikörper gegen CD31 (A, D; rot) zur Visualisierung von Endothelzellen und einem Antikörper gegen GFP (B, E; grün) gefärbt. C und F stellen eine Überlagerung aus A und B bzw. D und E dar. Pfeile: GFP-positiv/CD31-positiv Gefäße; Pfeilspitzen: GFP-negativ/CD31-positiv Gefäße. Maßstab: 13 μ m.

Dabei war der Anteil GFP-positiver Gefäße im Zentrum der Integra®-Scaffolds, die mit kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt waren, signifikant erhöht (Abbildung 22B).

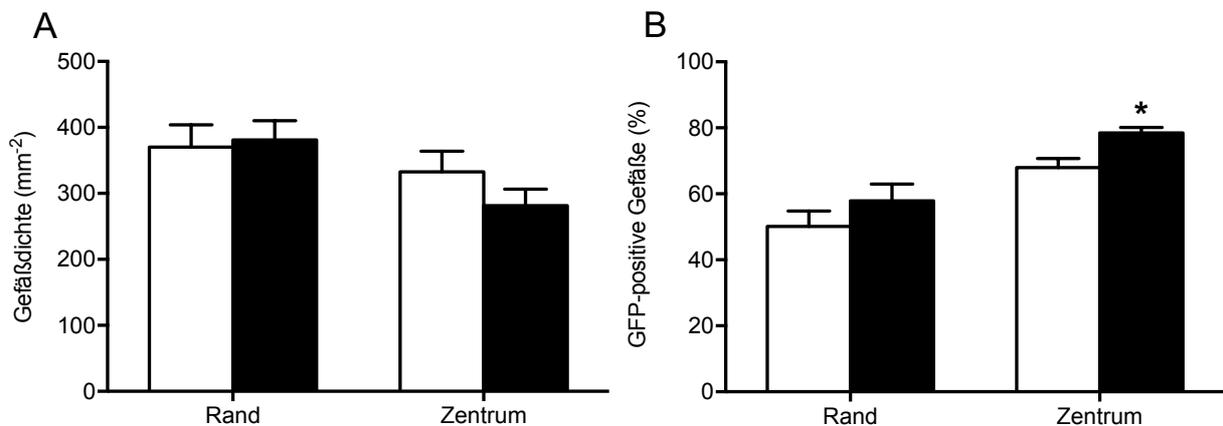


Abbildung 22: Gefäßdichte (A; mm^{-2}) und GFP-positiv Gefäße (B; %) im Randbereich und Zentrum von Integra®-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Scaffolds wurden mit frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten (Kontrolle, weiße Balken; n = 9) oder mikrovaskulären Fragmenten nach Kryokonservierung (schwarze Balken; n = 9) besiedelt. Mittelwert \pm SEM. *p < 0.05 vs. Kontrolle.

Im Randbereich der Implantate wurden ebenfalls 50-60 % GFP-positive Gefäße innerhalb des Granulationsgewebes gefunden. Damit konnte belegt werden, dass GFP-positive mikrovaskuläre Fragmente von den Implantaten in den umliegenden Randbereich aussprossen.

Zusammengefasst bestätigen die intravitalmikroskopischen sowie die immunhistochemischen Ergebnisse die gute *in vivo* Vaskularisierungskapazität von kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten, die sich nicht signifikant von der Vaskularisierungskapazität frisch isolierter Kontrollfragmente unterscheidet.

6.3. EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

6.3.1. *In vitro* Analysen

6.3.1.1. Proteinexpression

Die EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmente wurden zunächst mithilfe eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Arrays untersucht. Hierbei wurden 53 Angiogenese-assoziierte Proteine analysiert. EPO-behandelte und Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente wurden miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass ausschließlich pro-angiogene Faktoren wie Fractalkine, Epidermal Growth Factor (EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF) und VEGF durch die Behandlung mit EPO hochreguliert wurden (*Tabelle 4*). Andererseits verringerte EPO die Expression vieler untersuchter Proteine, darunter zahlreiche anti-angiogene Faktoren wie Endostatin, Thrombospondin (TSP)-2 und Pentraxin (PTX)-3. Allerdings wurden auch pro-angiogene Proteine wie MMP-3 und Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-AA herunterreguliert (*Tabelle 4*).

Protein	Expression (% der Kontrolle)
Fractalkine/CX3CL 1	156,3
EGF	127,9
KGF/FGF-7	122,5
VEGF/VPF	121,9
MMP-8	118,4
IL-1beta	113,2
IGFBP-3	112,8
SDF-1/CXCL 12	112,5
IGFBP-2	104,8
Serpin E1/PAI-1	102,0
Angiopoietin-3/Ang-3	101,9
Cyr61/CCN1, IGFBP-10	96,4
ADAMTS1/METH1	95,7
DLL4	95,2
Endothelin-1/ET-1	95,1
FGF acid/FGF-1/ECGF/HBGF-1	94,4
Angiopoietin-1/Ang-1	94,1
HGF	93,5
IL-10/CSIF	91,8
PIGF-2	91,7
HB-EGF	91,4
FGF basic/FGF-2	91,3
TIMP-1	88,6
Angiogenin/ANG	85,5
Osteopontin/OPN	85,2
PD-ECGF	85,0
GM-CSF	84,9
TIMP-4	82,5
KC/CXCL1/CINC-1/GRO-alpha	82,2
Endoglin/CD105	79,5
Amphiregulin/AR	78,9
DPP IV/CD26	77,8
Proliferin	76,6
NOV/CCN3/IGFBP-9	76,6
Platelet Factor 4/CXCL4/PF4	73,7
Serpin F1/PEDF	73,2
PDGF-AB/BB	71,7
Prolactin/PRL	71,5
Coagulator Factor III/Tissue Factor/TF	71,2
CXCL 16	69,5
IL-1alpha	68,9
IP-10/CXCL 10	68,4
MMP-9	68,2
Endostatin/Collagen VIII	68,0
IGFBP-1	65,2
Pentraxin-3/PTX3/TSG-14	64,9
Thrombospondin-2/TSP-2	64,3
VEGF B/VRF	63,6
MCP-1/CCL2/JE	63,5
Leptin/OB	57,9
MIP-1alpha	40,4
PDGF-AA	38,6
MMP-3	29,8

Tabelle 4: Expression von 53 Angiogenese-relevanten Proteinen, die mithilfe eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Arrays in EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten bestimmt wurde ($n = 2$ Wiederholungen). Die Werte sind in Prozent der Kontrolle (Vehikel-behandelte mikrovaskuläre Fragmente) angegeben.

6.3.1.2. Viabilität und Proliferation

Die Viabilität und Proliferation von mikrovaskulären Fragmenten nach EPO- oder Vehikel-Behandlung und Besiedlung auf Integra®-Scaffolds wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Dazu wurden CD31-Casp-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbungen angefertigt (Abbildung 23). Die mikrovaskulären Fragmente wiesen eine typische Gefäßmorphologie mit CD31-positiven Endothelzellen auf, die auf ihrer Außenseite durch anliegende CD31-negative perivaskuläre Zellen stabilisiert wurden (Abbildung 23A - D).

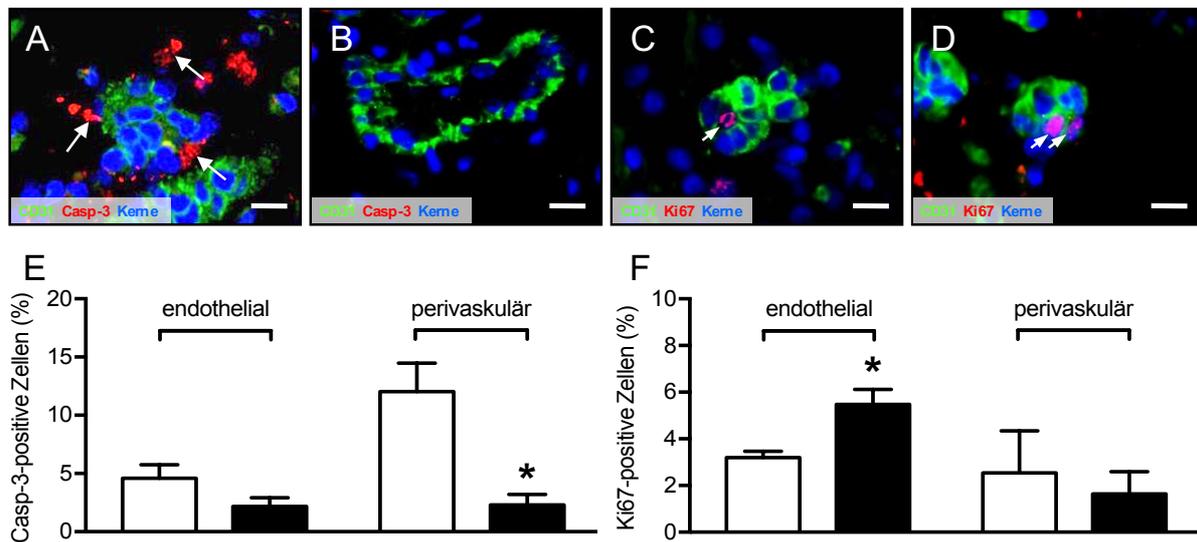


Abbildung 23: A - D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vehikel-behandelten (A, C) und EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten (B, D) direkt nach ihrer Besiedlung auf Integra®-Scaffolds. Die mikrovaskulären Fragmente wurden mit Hoechst 33342 (A - D; blau) zur Detektion der Zellkerne und einem Antikörper gegen CD31 (A - D; grün) zur Visualisierung von Endothelzellen gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Kombination mit einem Antikörper gegen Casp-3 (A, B; rot, Pfeile) zur Darstellung von apoptotischen Zellen oder einem Antikörper gegen Ki67 (C, D; rot, Pfeile) zur Identifikation proliferierender Zellen. Maßstab: 10 µm. E, F: Casp-3-positive (E; %) und Ki67-positive Zellen (F; %) innerhalb Vehikel-behandelter (Kontrolle, weiße Balken; n = 4) und EPO-behandelter mikrovaskulärer Fragmente (schwarze Balken; n = 4). Mittelwert ± SEM. *p < 0.05 vs. Kontrolle.

In beiden Gruppen wurden innerhalb der mikrovaskulären Fragmente weniger als 5 % apoptotische Endothelzellen gefunden. Im Gegensatz dazu waren 10-15 % der perivaskulären Zellen in den Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten apoptotisch. EPO-behandelte mikrovaskuläre Fragmente wiesen weniger als 5 % apoptotische perivaskuläre Zellen auf (Abbildung 23E). Darüber hinaus zeigte die

Ki67-Färbung, dass EPO-behandelte Fragmente mit ~ 6 % eine signifikant höhere Anzahl proliferierender Endothelzellen enthielten (*Abbildung 23F*).

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass eine Vorbehandlung mit EPO sowohl die Viabilität als auch die Proliferation der mikrovaskulären Fragmente fördert.

6.3.2. In vivo Analysen

6.3.2.1. Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

Die mikrovaskulären Fragmente beider Versuchsgruppen bildeten nach ihrer Besiedlung auf Integra[®]-Scaffolds ein mikrovaskuläres Netzwerk aus (*Abbildung 24A - D*). Dabei führte eine Behandlung mit EPO zu einer beschleunigten Ausbildung von Gefäßsprossen und -knospen, die mit dem umliegenden Empfängergewebe Verbindungen eingingen. Dementsprechend wiesen Scaffolds mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten bereits am 3. Tag nach ihrer Implantation erste perfundierte Gefäße auf. Zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt konnten in der Kontrollgruppe keine Anzeichen einer Perfusion nachgewiesen werden (*Abbildung 24E*).

Im weiteren Verlauf entwickelten sich in beiden Versuchsgruppen mikrovaskuläre Netzwerke in den Poren der implantierten Integra[®]-Scaffolds. In beiden Gruppen waren an Tag 6 und 10 jeweils 90 % und 100 % perfundierte ROIs zu finden (*Abbildung 24E*). Die Dichte der mikrovaskulären Netzwerke nahm während des Beobachtungszeitraums in beiden Gruppen kontinuierlich zu, wobei die Scaffolds, die mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, ab Tag 6 eine signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte aufwiesen. Die funktionelle Kapillardichte betrug in der EPO-Gruppe an Tag 14 $> 300 \text{ cm/cm}^2$, während sie in der Kontrollgruppe an Tag 14 nur $\sim 250 \text{ cm/cm}^2$ betrug (*Abbildung 24F*).

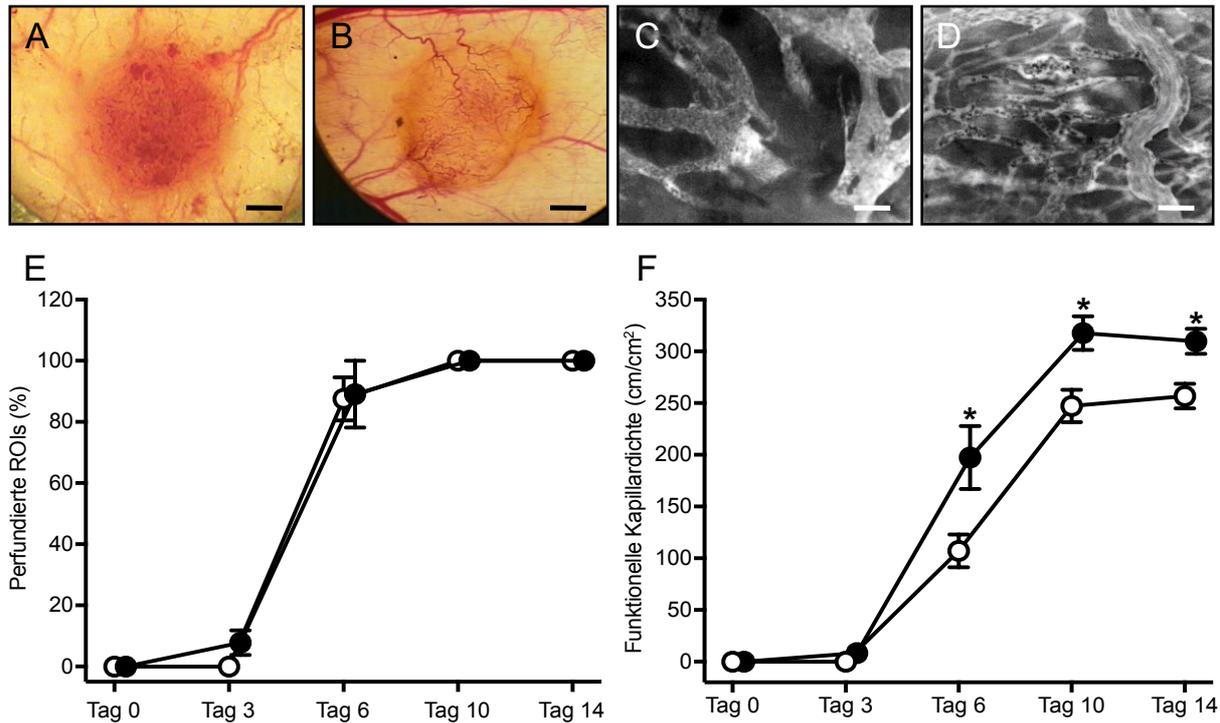


Abbildung 24: A – D: Stereomikroskopische (A, B) und intravitalfluoreszenzmikroskopische (C, D; Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-Dextran 150.000 i.v.) Aufnahmen von Integra®-Scaffolds, die mit Vehikel-behandelten (A, C) und EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten (B, D) besiedelt wurden. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 6 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Implantate mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten (B, D) weisen ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Maßstab: A, B: 0,6 mm; C, D: 55 µm. E, F: Perfundierte ROIs (E; %) und funktionelle Kapillardichte (F; cm/cm²) der Integra®-Scaffolds direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Scaffolds wurden mit Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Kreise; n = 8) oder EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten (schwarze Kreise; n = 8) prävascularisiert. Mittelwert ± SEM. *p < 0.05 vs. Kontrolle.

6.3.2.2. Mikrohämodynamik

Die Parameter Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Scherrate wurden für individuelle Gefäße innerhalb der mikrovaskulären Netzwerke in den implantierten Integra®-Scaffolds erfasst (Abbildung 25). Gefäße innerhalb der Scaffolds, die mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, wiesen geringere Gefäßdurchmesser und höhere Blutzellgeschwindigkeiten auf (Abbildung 25A - D). Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser lag am 3. Tag nach Implantation in der EPO-Gruppe bei ~ 50 µm und reduzierte sich bis Tag 14 auf ~ 15 µm. In der Kontrollgruppe wurden hingegen an Tag 6 bzw. Tag 14 Durchmesser von ~ 45 µm bzw. 20 µm

gemessen. Der Abfall des Gefäßdurchmessers bei ansteigender Blutzellgeschwindigkeit ist charakteristisch für die Ausreifung von Gefäßen [LASCHKE et al., 2014].

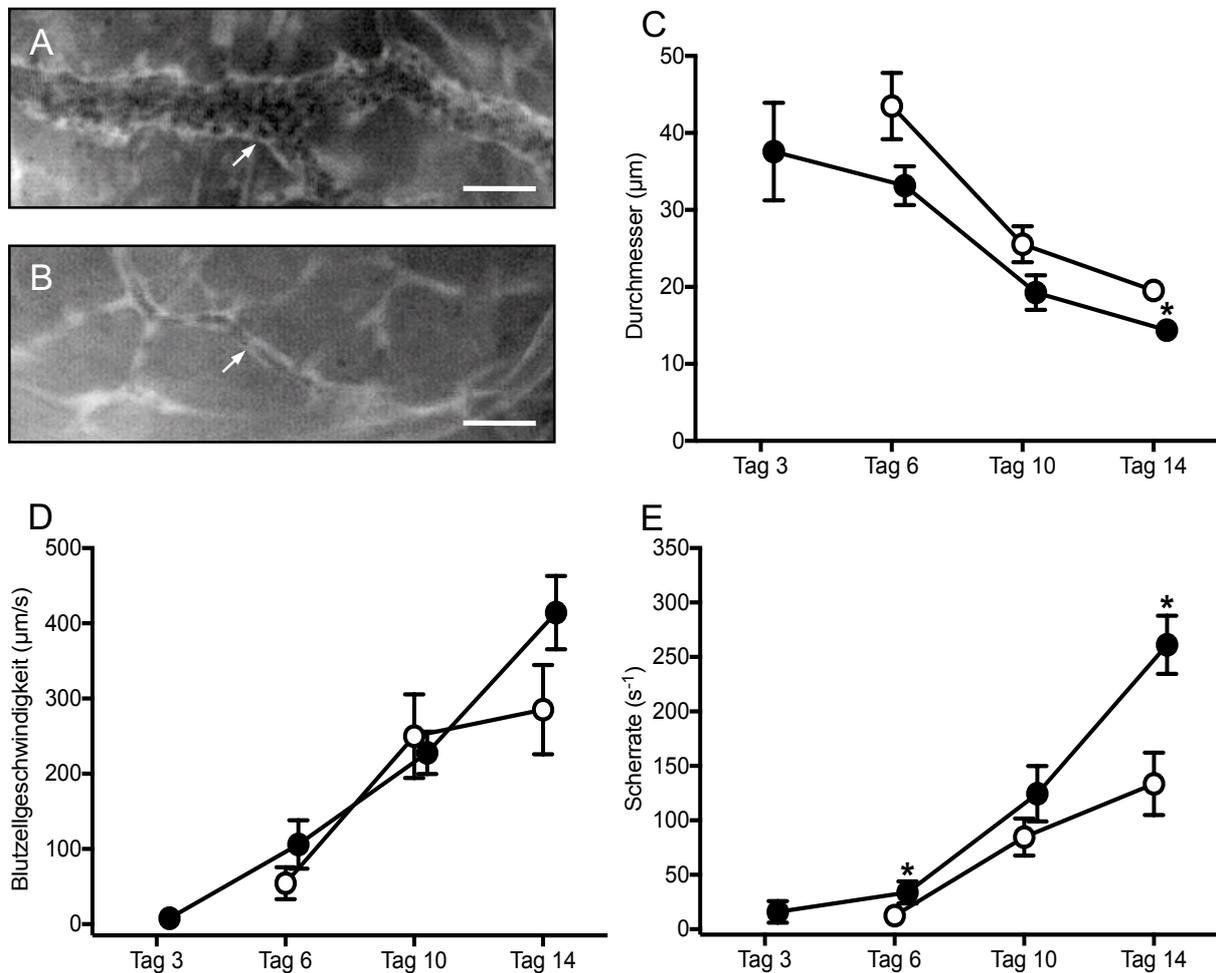


Abbildung 25: **A, B:** Intravital Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination von Integra[®]-Scaffolds, die mit Vehikel-behandelten (A) und EPO-behandelten (B) mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden. Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-Dextran 150.000 i.v.. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Gefäße in A (Pfeil) weisen höhere Durchmesser als Gefäße in B (Pfeil) auf. Maßstab: 40 µm. **C - E:** Durchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) und Scherrate (s⁻¹) von Gefäßen innerhalb von Integra[®]-Scaffolds, die mit Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Kreise; n=8) oder EPO-behandelten (schwarze Kreise; n=8) mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden. Die dargestellten Parameter wurden an Tag 3, 6, 10 und 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer gemessen. Mittelwert ± SEM. *p < 0.05 vs. Kontrolle.

Aus dem niedrigen Gefäßdurchmesser und der hohen Blutzellgeschwindigkeit der EPO-Gruppe resultierte eine hohe Scherrate (Abbildung 25E). Insgesamt wies die

EPO-Gruppe demnach verbesserte mikrohämodynamische Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Nach Abschluss der intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lag der Hämatokrit-Wert in der EPO-Gruppe bei 32 ± 1 % und in der Kontrollgruppe bei 35 ± 1 %. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

6.3.2.3. Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds

Im Anschluss an den 14-tägigen Untersuchungszeitraum wurde das Rückenhautkammerngewebe einschließlich der Implantate vorsichtig exzidiert und für histologische Untersuchungen aufbereitet. Die HE-Färbung zeigte, dass sich in beiden Versuchsgruppen ein dichtes Granulationsgewebe innerhalb der Poren der Integra[®]-Scaffolds und im umliegenden Empfängergewebe ausgebildet hatte. Die Implantate der beiden Versuchsgruppen waren somit an Tag 14 gut inkorporiert.

Zusätzlich wurde das Granulationsgewebe immunhistochemisch analysiert. Dabei konnte in beiden Versuchsgruppen innerhalb der Integra[®]-Scaffolds eine vergleichbare Dichte CD31-positiver Gefäße nachgewiesen werden (*Abbildung 26 und 27*).

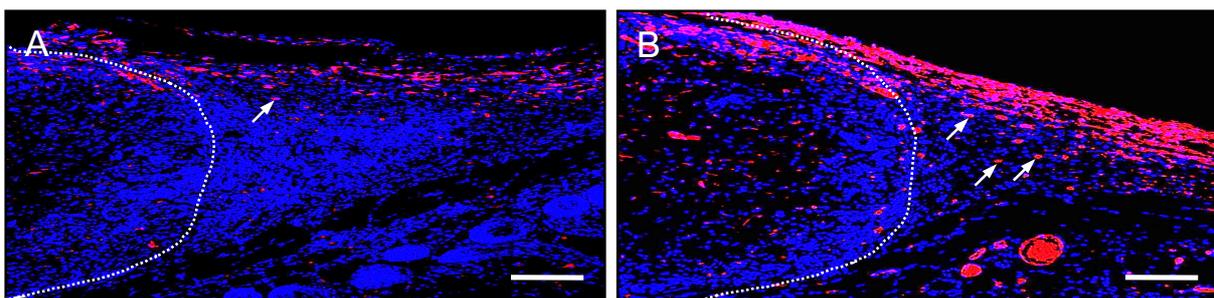


Abbildung 26: Immunhistochemische Detektion CD31-positiver Gefäße (Pfeile) im Randbereich von Integra[®]-Scaffolds (Ränder mit gepunkteter Linie markiert), die mit Vehikel-behandelten (A) oder EPO-behandelten (B) mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden. Die Analyse erfolgte an Tag 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Schnitte wurden mittels Hoechst 33342 (blau) zur Detektion der Zellkerne und einem Antikörper gegen CD31 (rot) zur Visualisierung der Endothelzellen gefärbt. Maßstab: 140 μ m.

Im randständigen Granulationsgewebe wurde ebenfalls die Anzahl der Gefäße untersucht. In diesem Bereich konnte in der EPO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erheblich gesteigerte Dichte CD31-positiver Gefäße gefunden werden (Abbildung 26 und 27A - G).

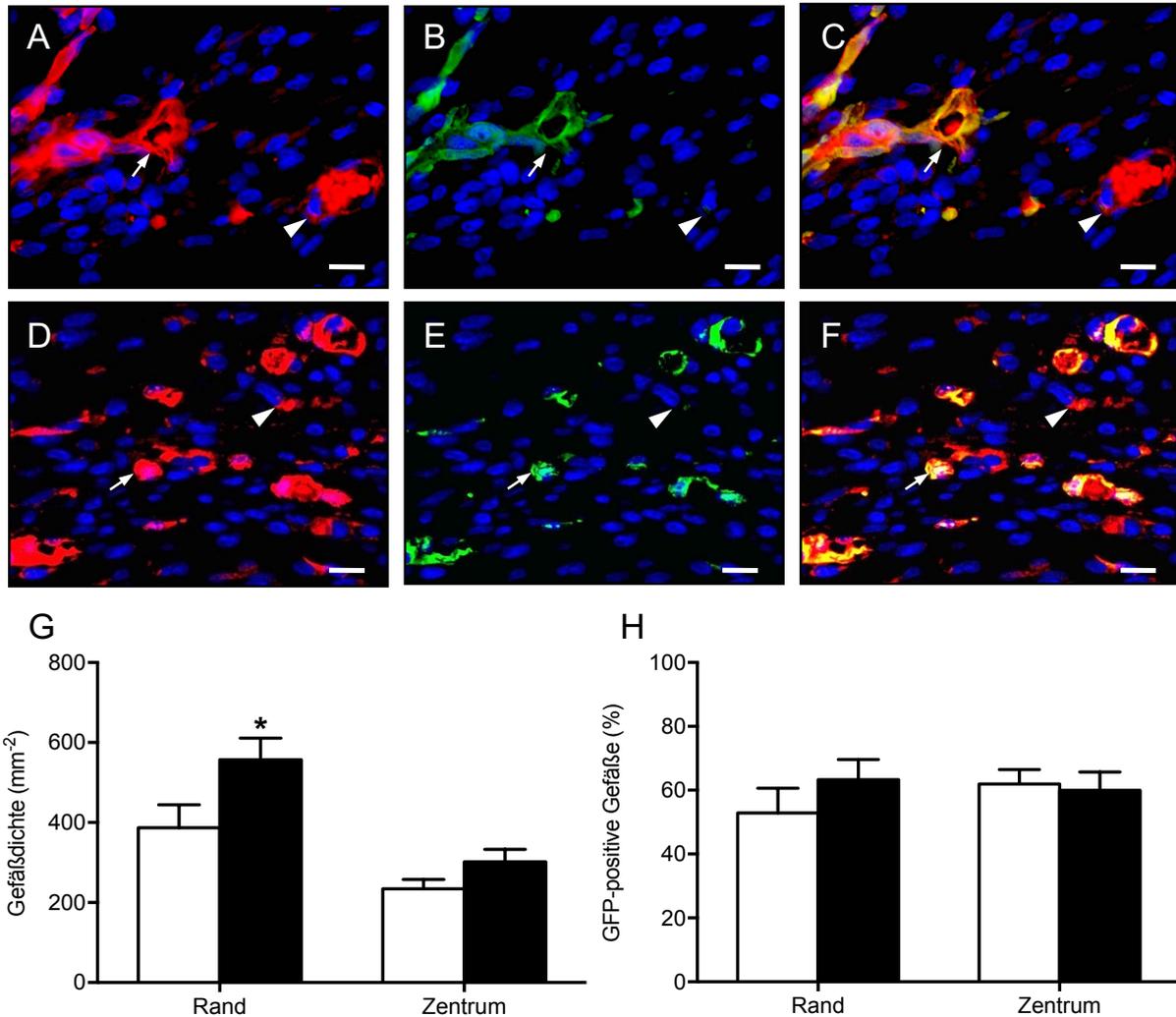


Abbildung 27: A – F: Immunhistochemische Charakterisierung des mikrovaskulären Netzwerks im Randbereich von Integra[®]-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Scaffolds wurden mit Vehikel-behandelten (A - C) und EPO-behandelten (D – F) mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Die Schnitte wurden mittels Hoechst 33342 (A - F; blau) zur Detektion der Zellkerne, einem Antikörper gegen CD31 (A, D; rot) zur Visualisierung von Endothelzellen und einem Antikörper gegen GFP (B, E; grün) gefärbt. C und F stellen eine Überlagerung aus A und B bzw. D und E dar. Pfeile: GFP-positive/CD31-positive Gefäße; Pfeilspitzen: GFP-negativ/CD31-positive Gefäße. Maßstab: 13 μ m. G, H: Immunhistochemisch ermittelte Gefäßdichte (G; mm⁻²) und GFP-positive Gefäße (H; %) im angrenzenden Rand und Zentrum von Integra[®]-Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. Die Scaffolds wurden mit Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken; n = 8) oder EPO-behandelten (schwarze Balken; n = 8) mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Mittelwert \pm SEM. *p < 0.05 vs. Kontrolle.

Außerdem wiesen die Implantate beider Gruppen einen Anteil von ~ 60 % GFP-positiven Gefäße auf. Die GFP-positiven Gefäße stellen mikrovaskulären Fragmente dar, die nach Implantation in den Scaffolds überlebten. Im randständigen Granulationsgewebe wurden ebenfalls über 50 % GFP-positive Gefäße gefunden. Demnach wuchsen die mikrovaskulären Fragmente sogar von den Scaffolds in das umliegende Gewebe aus (*Abbildung 27A – F*). Hinsichtlich des Anteils von GFP-positiven Gefäßen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (*Abbildung 27H*).

Zusammengefasst bestätigen die intravitalmikroskopischen und immunhistochemischen Ergebnisse den stimulatorischen, pro-angiogenen Einfluss von EPO auf mikrovaskuläre Fragmente.

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der Einfluss einer Kryokonservierung bzw. einer Behandlung mit EPO auf mikrovaskuläre Fragmente untersucht.

Im **ersten Studienabschnitt** wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Nach Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten sind keine Veränderungen ihrer Morphologie und ihrer zellulären Zusammensetzung nachweisbar. Allerdings sind im Anschluss an eine Kryokonservierung deutlich weniger mikrovaskuläre Fragmente zur weiteren Verwendung verfügbar als direkt nach der Isolierung.
2. Eine Kryokonservierung führt zu einem deutlich gesteigerten Anteil nekrotischer Zellen innerhalb mikrovaskulärer Fragmente. Allerdings wird auch die Expression pro-angiogener Proteine innerhalb der mikrovaskulären Fragmente induziert. In der Folge werden im Vergleich zu frisch isolierten Kontrollen höhere Mengen der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF aus den kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten freigesetzt.

3. Integra[®]-Scaffolds, die mit frisch isolierten oder kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt werden, bilden rasch ein dichtes Gefäßnetzwerk aus. Dabei hat die vorangehende Kryokonservierung der mikrovaskulären Fragmente keine Auswirkung auf die Dichte und die mikrohämodynamischen Parameter des Gefäßnetzwerks. Mikrovaskuläre Fragmente nach Kryokonservierung zeigen ein verstärktes Wachstum, wodurch Scaffolds mit kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten einen höheren Anteil präformierter, GFP-positiver Gefäße aufweisen.

Im **zweiten Studienabschnitt** wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Eine Behandlung mit EPO steigert die Viabilität und die Proliferation mikrovaskulärer Fragmente. Zusätzlich fördert EPO die Bildung von pro-angiogenen Proteinen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente und senkt die Expression vieler anti-angiogener Proteine.
2. EPO-behandelte mikrovaskuläre Fragmente induzieren die rasche Bildung eines Gefäßnetzwerkes innerhalb von implantierten Integra[®]-Scaffolds. Dabei formt sich das Netzwerk schneller und dichter als in Scaffolds, die mit Vehikel-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden. Zusätzlich beschleunigt EPO die Ausreifung des Gefäßnetzwerks, was mit geringeren Gefäßdurchmessern und höheren Scherraten einhergeht. Außerdem weisen die Integra[®]-Scaffolds der EPO-Gruppe im Randbereich sowohl mehr GFP-positive als auch mehr GFP-negative Gefäße auf. Dies zeigt, dass eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Zahl präformierter mikrovaskulärer Gefäße aus den implantierten Scaffolds in das umliegende Gewebe wächst und auch eine erhöhte Anzahl von Gefäßen aus dem Empfängergewebe im Randbereich der Implantate vorliegt.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Modell der Rückenhautkammer

In der vorliegenden Arbeit wurde zur tierexperimentellen Untersuchung der Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten das Modell der Rückenhautkammer verwendet. Dabei sollte die Entwicklung von Gefäßnetzwerken innerhalb von prävascularisierten Implantaten unter möglichst physiologischen Bedingungen analysiert werden.

Die Nutzung eines transparenten Fensters zur Beobachtung von lebendem Gewebe wurde durch SANDISON [1924] erstmals am Kaninchenohr etabliert. ALGIRE [1943] übertrug das Modell von SANDISON auf den Rücken der Maus. Der Ansatz von ALGIRE eröffnete die Möglichkeit, am Mausrücken Fett, Bindegewebe und quergestreiften Unterhautmuskel mithilfe von auffallendem Licht zu untersuchen. Durch den zusätzlichen Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes wie FITC-Dextran und hochauflösender intravitaler Fluoreszenzmikroskopie können einzelne Blutgefäße innerhalb der Rückenhautkammer in Echtzeit dargestellt werden. Die Analysen sollen unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, ohne die Mikrozirkulation zu beeinträchtigen. Neben der sorgfältigen Präparation der Rückenhautkammer ist dabei das Material des Kammerrahmens entscheidend. Zurzeit wird meistens auf Rückenhautkammern aus Titan zurückgegriffen. Titan zeichnet sich nicht nur durch eine gute Biokompatibilität und ein geringes Gewicht aus, sondern auch durch eine hohe Stabilität [PALMER et al., 2011]. Heute stellt die Rückenhautkammer ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung von Biomaterialien und Transplantaten dar [MENGER et al., 2002].

Die Präparation der Kammer ist in unterschiedlichen Spezies möglich. Neben der ursprünglichen Anwendung in immunkompetenten Mäusen durch ALGIRE [1943] wird das Modell heute auch in Hamstern [ENDRICH et al., 1980], Ratten [PAPENFUSS et al., 1979] oder immuninkompetenten Mäusen [LEHR et al., 1993] eingesetzt. Obwohl

die Präparation der Rückenhautkammer der Maus aufgrund der geringen Tiergröße und intermuskulären Verwachsungen anspruchsvoller als beispielsweise in Hamstern ist, wird die Maus am häufigsten verwendet [LASCHKE et al., 2011]. Mäuse werden im Vergleich zu anderen Spezies als Versuchstiere am meisten eingesetzt und sind genetisch sehr gut charakterisiert. Entsprechend steht für verschiedenste Untersuchungen ein breites Spektrum an Knockout-Stämmen, transgenen Linien und Antikörpern kommerziell zur Verfügung [LASCHKE et al., 2010]. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine GFP-positive Mauslinie zur Isolierung der mikrovaskulären Fragmente eingesetzt.

Zur Visualisierung und Analyse der Mikrozirkulation steht heute neben der Rückenhautkammer eine Vielzahl von weiteren Tiermodellen zur Verfügung. Diese Modelle umfassen beispielsweise die akute Präparation des Mesenteriums, des Omentums oder des Kremastermuskels [GAVINS & CHATTERJEE, 2004; RUMBAUT et al., 2006]. Die genannten Ansätze ermöglichen allerdings nur die einmalige Analyse des präparierten Gebiets im sofortigen Anschluss an die Operation. Im Gegensatz dazu bietet die Rückenhautkammer den Vorteil, dass die Untersuchung des Präparationsgebietes zeitversetzt zum chirurgischen Eingriff erfolgt. So können Einflüsse des akuten chirurgischen Traumas, wie eine inflammatorische Gewebeantwort, minimiert werden. Analysen in der Rückenhautkammer können weiterhin über einen Zeitraum von mehreren Wochen wiederholt werden. Dadurch ermöglicht dieses Modell im Gegensatz zu anderen Tiermodellen eine longitudinale Analyse der Gefäßentwicklung [LASCHKE et al., 2011]. Gleichzeitig erlaubt die Konstruktion des Kammerrahmens die Abnahme des Deckglases, welches das Beobachtungsfenster verschließt. Die Implantation von unterschiedlichen Geweben oder Biomaterialien in die Rückenhautkammer ist somit vergleichsweise einfach [VAJKOCZY et al., 1998; VAJKOCZY et al., 2000; SPÄTER et al., 2017].

Aufgrund der genannten Eigenschaften wurde die Rückenhautkammer bereits in früheren Studien zur Untersuchung von mikrovaskulären Fragmenten und Integra®-Scaffolds eingesetzt [LASCHKE et al., 2012; GRÄSSER et al., 2016; FRUEH et al., 2017]. Im Kammermodell sollte bei dem Einsatz von Biomaterialien eine Implantatgröße von 3 x 3 x 1 mm nicht überschritten werden, da der Durchmesser des Beobachtungsfensters nur 10 mm beträgt. Bei größeren Implantaten könnte daher das umliegende Empfängergewebe im Randbereich der Implantate nicht mehr untersucht

werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher nur Integra[®]-Scaffolds mit einem Durchmesser von 3 mm verwendet.

7.1.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Es stehen verschiedene Methoden zur Untersuchung der Mikrozirkulation in Tiermodellen zur Verfügung. Dazu zählen zum einen indirekte Techniken zur Visualisierung des Gefäßsystems, wie beispielsweise die Mikrosphären-Technik, die Photoplethysmographie oder die Elektronen-Spin-Resonanz-Messung [ZWISSLER et al., 1991; MALVEZZI et al., 1992; WEISSMANN et al., 2005]. Im Gegensatz dazu stellt die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik eine direkte Methode zur Darstellung des Gefäßsystems dar. Durch die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, die Licht emittieren können, ist es möglich auch die Mikrozirkulation nicht transilluminierbarer Gewebe wie Knochen, Leber, Gehirn oder Muskel hochauflösend zu visualisieren [TAVASSOL et al., 2011; MARQUES et al., 2015; TAKEHARA et al., 2015; CHOI et al., 2015]. Des Weiteren können durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe neben molekularen Mechanismen, wie Apoptose, auch dynamische Vorgänge, wie das Fließverhalten korpuskulärer Blutbestandteile, untersucht werden [BARON et al., 2011; SETHI et al., 2011]. Entsprechend erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die Nutzung des Plasma-Markers FITC-Dextran die Visualisierung aller Abschnitte des Gefäßsystems, bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen, innerhalb der Rückenhautkammer. Außerdem konnten die neu gebildeten mikrovaskulären Netzwerke in den implantierten Integra[®]-Scaffolds, bestehend aus mikrovaskulären Fragmenten und einwachsenden Empfängergefäßen, analysiert werden.

Zu Beginn jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Gabe des Plasma-Markers FITC-Dextran in den retrobulbären Venenplexus. Da der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund seines hohen Molekulargewichts bei intaktem Endothel innerhalb der Gefäße verbleibt und nur das Blutplasma anfärbt, ermöglicht er hämodynamische Messungen [LEHR et al., 1993]. Bei der Durchführung der Untersuchungen muss die Dosis des Farbstoffs und die Belichtungszeit auf ein Minimum beschränkt werden. Beim Einsatz von FITC-Dextran unter hohen Lichtintensitäten können die angeregten Fluorochrome nämlich dosisabhängig freie

Sauerstoffradikale bilden sowie das Gewebe durch eine lange Belichtungsdauer überwärmt werden [STEINBAUER et al., 2000]. Die dabei ausgelösten phototoxischen Effekte auf das Kammergewebe führen zu einer vermehrten Leukozyten-Endothel-Interaktion, einer Blutplättchenaktivierung mit Thrombusbildung, Vasospasmen und kapillarem Perfusionsversagen mit Verringerung der funktionellen Kapillardichte [REED & MILLER, 1988; FRIESENECKER et al., 1994; SAETZLER et al., 1997; STRÜDER et al., 2017]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit FITC-Dextran in einer niedrigen Dosierung von 0,1 ml genutzt. Diese Dosierung wurde bereits in anderen Studien erfolgreich zur Untersuchung der Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer angewendet [FRUEH et al., 2017]. Außerdem wurde die 20-minütige Mikroskopie auf Video gespeichert und zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet. Dadurch konnte die Belichtungs- und Narkosedauer auf das notwendige Mindestmaß reduziert und somit das Kammergewebe sowie die Versuchstiere bestmöglich geschont werden.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

Die Kryokonservierung ist eine Technik zur Langzeit-Lagerung von Zellen und Geweben [ONOFRE et al., 2016; JADOUL et al., 2017]. Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass auch kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente dazu in der Lage sind, sich *in vivo* miteinander und mit den Gefäßen des umliegenden Gewebes zu verbinden. Auf diese Weise entsteht in Implantaten in kurzer Zeit ein neues, funktionelles mikrovaskuläres Netzwerk (*Abbildung 28*).

Für die Kryokonservierung der mikrovaskulären Fragmente wurde in der vorliegenden Arbeit als Kryoprotektivum DMSO verwendet, das auch in vielen anderen Protokollen zur Kryokonservierung von Einzelzellen oder Zellverbänden, wie Langerhans'schen Inseln, eingesetzt wird [MIRANDA et al., 2013; SULTANI et al., 2016].

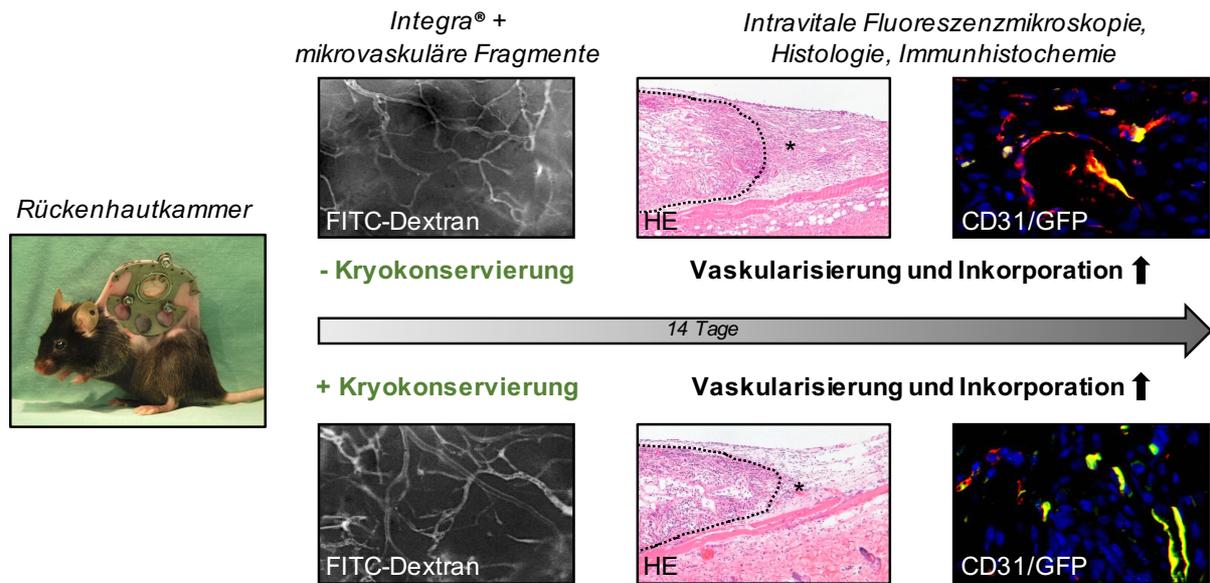


Abbildung 28: Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Studienabschnitts. Frisch isolierte und kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente bilden *in vivo* ein vergleichbares Gefäßnetzwerk aus. Entsprechend führen auch kryokonservierte Fragmente zu einer guten Vaskularisierung und Inkorporation von prävascularisierten Integra®-Scaffolds in das Gewebe der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen.

Durch eine Kryokonservierung und den anschließenden Auftauvorgang reduziert sich meist die Anzahl der verfügbaren Zellen [HIGGINS et al., 2011]. Entsprechend verminderte sich auch in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der mikrovaskulären Fragmente nach Kryokonservierung. Dies kann auf einer Zellschädigung durch den durchgeführten Einfrier- und Auftauvorgang beruhen. So führen rapide Temperaturänderungen während einer Kryokonservierung typischerweise zu Gewebeschäden des einzufrierenden Gewebes [KARLSSON & TONER, 1996], die durch unterschiedliche Mechanismen induziert werden. Zu diesen gehören eine intrazelluläre Kristallbildung sowie ein metabolisches Ungleichgewicht aufgrund der Beeinflussung temperaturabhängiger Prozesse [WOODS et al., 2016]. Den Gewebeschäden durch die Bildung von Eiskristallen soll durch die Anwendung von DMSO entgegengewirkt werden. DMSO weist allerdings selbst zytotoxische Effekte auf [YUAN et al., 2014]. Folglich konnte im Vergleich zu frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten innerhalb der kryokonservierten Fragmente eine erhöhte Anzahl von nekrotischen Zellen nachgewiesen werden.

Die Kryokonservierung veränderte aber weder die Morphologie, noch die durchschnittliche Länge oder zelluläre Zusammensetzung der mikrovaskulären

Fragmente. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die reduzierte Anzahl der mikrovaskulären Fragmente nicht primär durch Zerstörung, sondern eher durch das zusätzliche Waschen der Fragmente im Rahmen des Auftauprozesses bedingt war. Das Waschen mit PBS ist nötig, um das zytotoxische DMSO vor der weiteren Nutzung der mikrovaskulären Fragmente weitgehend zu entfernen. Hierfür müssen sie mehrmals zentrifugiert werden. Die wiederholte Zentrifugation von biologischem Material kann jedoch nach LAROCHE et al. [2005] zu einem relevanten Verlust von zellulärem Material führen.

Die Kryokonservierung induzierte eine starke angiogene Aktivierung der mikrovaskulären Fragmente. Dies zeigte sich durch eine erhöhte Expression zahlreicher Angiogenese-assoziiierter Proteine, die neben pro- auch anti-angiogene Faktoren wie Endostatin oder TSP-2 einschlossen [O'REILLY et al., 1997; STREIT et al., 1999]. Die höchsten Expressionsniveaus wurden vor allem für Proteine wie KC, MMP-8, IL-10, MCP-1 und IGFBP-3 gefunden, die eine starke pro-angiogene Wirkung haben [GRANATA et al., 2007; FANG et al., 2013; LOW-MARCHELLI et al., 2013; MIYAKE et al., 2013; NAKAMURA et al., 2015]. Folglich scheint die Kryokonservierung die intrazelluläre Balance von pro- und anti-angiogenen Faktoren zu beeinflussen. Gemäß dem Konzept des „angiogenic switch“ [FOLKMAN, 2002] verschiebt sich dabei durch Kryokonservierung das Gleichgewicht zu einem angiogenen Phänotyp, d.h. es überwiegen intrazellulär pro-angiogene Signalkaskaden und Proteine. Entsprechend konnte in der vorliegenden Studie auch eine gesteigerte Freisetzung der beiden Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF durch kryokonservierte Fragmente nachgewiesen werden. Beide Zytokine stimulieren die Bildung neuer Gefäße *in vivo* [LEY et al., 2004].

Der „angiogenic switch“ könnte durch die vermehrte Exposition der mikrovaskulären Fragmente mit freien Sauerstoffradikalen induziert worden sein. Diese werden im Rahmen der Kryokonservierung aufgrund der Temperatur- und Osmolaritätsveränderungen in großer Zahl gebildet [TATONE et al., 2010]. Weiterhin wurde oxidativer Stress bereits als starker Stimulus der Angiogenese beschrieben [KHATRI et al., 2004; KIM & BYZOVA, 2014]. Außerdem konnte durch *in vivo* Studien auch nachgewiesen werden, dass das Gefäßsystem des Fettgewebes einer besonderen Hypoxie-unabhängigen Regulation durch Kälte unterliegt. Die chronische Exposition von Fettgewebe mit Temperaturen von 4 °C bewirkte hierbei die

Hochregulation pro-angiogener und die Herunterregulation anti-angiogener Faktoren [XUE et al., 2009]. Auch die untersuchten mikrovaskulären Fragmente sind im Rahmen der Kryokonservierung einer niedrigen Temperatur ausgesetzt. So könnten die beschriebenen temperaturabhängigen Mechanismen auch im Rahmen der Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten vorübergehend aktiviert worden sein.

Die *in vivo* Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten wurde in der vorliegenden Arbeit in der Rückenhautkammer analysiert. Dabei bildeten sowohl kryokonservierte als auch frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente innerhalb der implantierten Integra®-Scaffolds ein gut perfundiertes Gefäßnetzwerk aus. Während des gesamten 14-tägigen Untersuchungszeitraums konnten keine Unterschiede zwischen den Gefäßnetzwerken der beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Allerdings standen nach der Kryokonservierung deutlich weniger mikrovaskuläre Fragmente zur Besiedlung der Scaffolds zur Verfügung. Aus diesem Grund kann geschlussfolgert werden, dass die übrigen mikrovaskulären Fragmente im Vergleich zu frisch isolierten Kontrollen sogar eine verbesserte Vaskularisierungskapazität aufwiesen. Diese Hypothese wird auch von den Ergebnissen der durchgeführten Proteomanalyse gestützt, bei der pro-angiogene Proteine vermehrt in den kryokonservierten Fragmenten exprimiert wurden. Bei der immunhistochemischen Analyse der Rückenhautkammerpräparationen konnte außerdem ein höherer Anteil GFP-positiver präformierter Gefäße innerhalb der mit kryokonservierten Fragmenten besiedelten Integra®-Scaffolds nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass verglichen mit der Kontrollgruppe eine größere Anzahl neu gebildeter Gefäße von den GFP-positiven mikrovaskulären Fragmenten stammte. Diese könnten ein stärkeres Wachstum aufweisen als frisch isolierte Fragmente und damit mehr zur Vaskularisierung der Implantate beigetragen haben.

Zusammenfassend wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit die Kryokonservierung als neue Methode zur Lagerung von mikrovaskulären Fragmenten eingeführt. Der Verlust von verfügbaren mikrovaskulären Fragmenten durch eine Kryokonservierung wird dabei durch eine erhöhte angiogene Aktivität der restlichen Fragmente kompensiert. Entsprechend stellt die Kryokonservierung eine erfolgsversprechende Strategie zur längerfristigen Lagerung von mikrovaskulären

Fragmenten als autologe, natürliche Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering dar.

7.2.1.1. Klinische Perspektiven

Mikrovaskuläre Fragmente können in großer Zahl aus Fettgewebe isoliert werden und weisen eine hohe Vaskularisierungskapazität auf. Entsprechend können sie zur Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten dienen und deren Durchblutung maßgeblich verbessern [LASCHKE et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Nachweis erbracht, dass durch Kryokonservierung die Aufbewahrung von *ad hoc* nutzbaren mikrovaskulären Fragmenten möglich ist.

Mikrovaskuläre Fragmente könnten aus dem verworfenen Fettgewebe von jungen Patienten isoliert werden, die sich einer Liposuktion oder einem anderen chirurgischen Eingriff unterziehen. Wie schon für Stammzellen etabliert [MARQUEZ-CURTIS et al., 2015], könnten die mikrovaskulären Fragmente anschließend kryokonserviert werden. Somit wäre zu einem späteren Zeitpunkt kein zusätzlicher Eingriff zur Gewinnung der mikrovaskulären Fragmente notwendig. Außerdem weisen die mikrovaskulären Fragmente von gealterten Spendern eine eingeschränkte Vaskularisierungskapazität auf [LASCHKE et al., 2014]. Durch die Kryokonservierung autologer mikrovaskulärer Fragmente im jungen Alter könnte dieser altersabhängige Verlust der Vaskularisierungskapazität vermieden werden. Eine Kryokonservierung könnte somit den erfolgreichen Einsatz von Fragment-basierten Vaskularisierungsstrategien, welche sonst aufgrund der eingeschränkten Vaskularisierungskapazität der mikrovaskulären Fragmente nur limitiert einsetzbar wären, im Alter ermöglichen.

7.2.2. EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass EPO mikrovaskuläre Fragmente stimuliert. Durch eine 24-stündige *in vitro* Behandlung mit EPO erhöhte sich die Viabilität und Proliferation der mikrovaskulären Fragmente. Außerdem induzierte EPO die Expression von pro-angiogenen Proteinen, während die

Expression anti-angiogener Proteine reduziert wurde. Entsprechend bildeten EPO-behandelte mikrovaskuläre Fragmente im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen wesentlich schneller neue Gefäßnetzwerke innerhalb von Integra®-Scaffolds aus. EPO steigert somit die *in vivo* Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten (Abbildung 29).

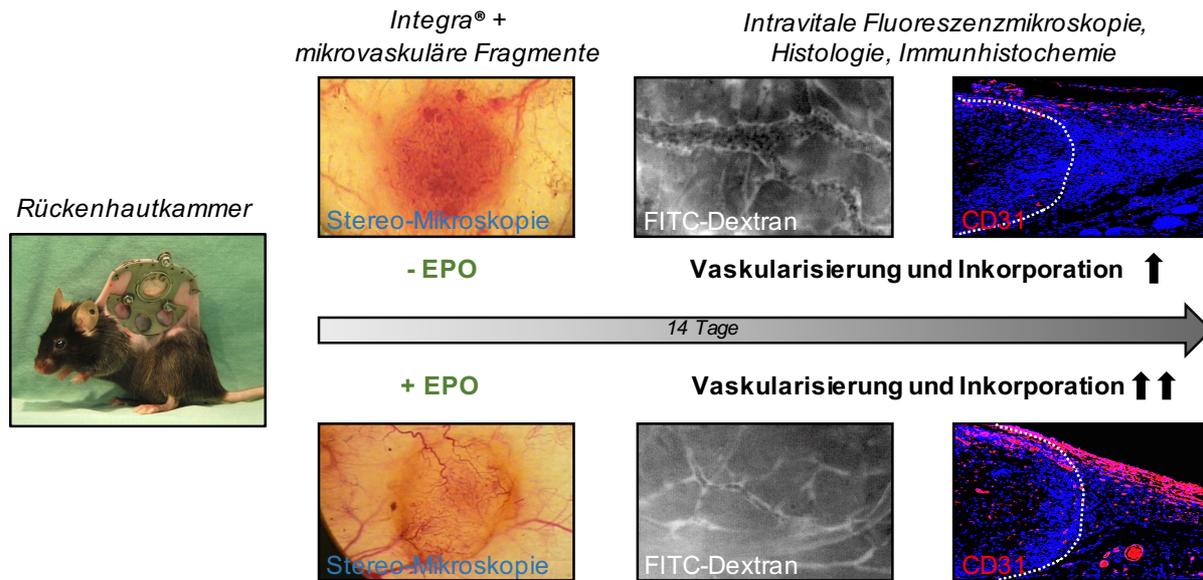


Abbildung 29: Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Studienabschnitts. Durch eine EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente wird *in vivo* die Bildung eines Gefäßnetzwerks gefördert. Entsprechend kann die Vaskularisierung und Inkorporation von prävaskularisierten Integra®-Scaffolds in das Gewebe der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen durch vorausgehende EPO-Stimulation der Fragmente verbessert werden.

Zur *ex situ* Vorbehandlung der mikrovaskulären Fragmente wurde eine Konzentration von 20 IU/ml des klinisch zugelassenen Epoetin beta benutzt. Bei der genannten Konzentration wurde von WATANABE et al. [2005] eine proliferative Wirkung auf retinale Endothelzellen nachgewiesen. Zusätzlich stimulierte diese Konzentration die Bildung von Blutgefäßen in einem Chorio-Allantois-Membran-Assay [RIBATTI et al., 1999]. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Anzahl proliferierender Endothelzellen in EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten gesteigert, während die Anzahl apoptotischer perivaskulärer Zellen deutlich reduziert war. Besonders perivaskuläre Zellen sezernieren zahlreiche Faktoren zur Steuerung der Angiogenese und Reifung von Blutgefäßen [TATTERSALL et al., 2016]. Eine gesteigerte Anzahl an

funktionstüchtigen perivaskulären Zellen kann deshalb das Gefäßwachstum zusätzlich verbessern.

Die anti-apoptotischen und proliferativen Effekte von EPO wurden bereits für nicht-hämatopoetisches Gewebe nachgewiesen und sind entscheidend von der Präsenz des EPO-Rezeptors EpoR abhängig [BAHLMANN et al., 2003; WARREN et al., 2011]. Dieser Rezeptor wird unter anderem auf Endothelzellen sowie perivaskulären Zellen einschließlich Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert. Hypoxie steigert durch Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen die Expression dieses Rezeptors [WANG et al., 2011; COKIC et al., 2014]. Unmittelbar nach der Isolierung sind mikrovaskuläre Fragmente durch die fehlende Durchblutung ebenfalls hypoxischem Stress ausgesetzt [GRÄSSER et al., 2016]. Somit ist davon auszugehen, dass mikrovaskuläre Fragmente besonders innerhalb der initialen Phase nach Isolierung von einer EPO-Behandlung profitieren könnten. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit frisch isolierte mikrovaskuläre Fragmente für 24 h in EPO-supplementiertem Medium kultiviert, bevor sie in die Rückenhautkammern von Empfängertieren transplantiert wurden. Durch die kurzzeitige *ex situ* Vorbehandlung mit EPO und dem anschließenden Waschen der Fragmente werden so auch potentielle Nebenwirkungen des Zytokins, wie ein Anstieg des Hämatokrits bei dauerhafter systemischer Anwendung, vermieden.

Die Aktivierung von EpoR und der nachgeschalteten JAK2/STAT5 Signalkaskade ist in die intrazelluläre Regulation zahlreicher pro-angiogener Zytokine involviert [WITTHUHN et al., 1993; ZWEZDARYK et al., 2007]. So konnte JAQUET et al. [2002] zeigen, dass EPO eine stark angiogene Wirkung aufweist, die mit der Wirkung von VEGF auf humane Endothelzellen vergleichbar ist. Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Proteomanalyse die Induktion einer erhöhten Expression pro-angiogener Faktoren innerhalb der EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmente nachgewiesen werden. Die höchsten Expressionslevel wurden hierbei für die pro-angiogenen Proteine Fractalkine, EGF, KGF und VEGF gefunden. Diese Proteine stellen Schlüsselmediatoren der Angiogenese dar [GILLIS et al., 1999; VAN CRUIJSEN et al., 2005; RYU et al., 2008]. Gleichzeitig verminderte die Behandlung mit EPO die Expression vieler anti-angiogener Faktoren wie Endostatin, TSP-2 und PTX-3 [STREIT et al., 1999; ABDOLLAHI et al., 2004; O'NEILL et al., 2016]. Folglich scheint

EPO die Proteinexpression innerhalb der mikrovaskulären Fragmente gemäß dem Konzept des „angiogenic switch“ [HANAHAH & FOLKMAN, 1996; FOLKMAN, 2002] zu verschieben. Dabei werden pro-angiogene Proteine gesteigert gebildet, während anti-angiogene Proteine vermindert exprimiert werden. Daraus resultiert eine angiogene Aktivierung der mikrovaskulären Fragmente.

Basierend auf den vielversprechenden *in vitro* Daten erfolgte anschließend die Analyse des Einflusses von EPO auf die *in vivo* Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente im Modell der Rückenhautkammer. Dabei zeigten Integra®-Scaffolds, die mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, eine beschleunigte Bildung von Gefäßnetzwerken. Ausschließlich Scaffolds der EPO-Gruppe wiesen schon am 3. Tag nach ihrer Implantation in die Rückenhautkammer durchblutete Gefäße auf. Auch die funktionelle Kapillardichte der sich entwickelnden Gefäßnetzwerke war zwischen den Untersuchungstagen 6-14 in der EPO-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesteigert. Daraus lässt sich schließen, dass die mikrovaskulären Fragmente durch eine Aktivierung mit EPO schneller Gefäßknospen ausbildeten. Die Gefäßknospen bildeten bereits zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt mit den umliegenden Gefäßen des Empfängergewebes Verbindungen aus. Dabei war auch die Reifung des mikrovaskulären Netzwerks beschleunigt. So wurden in individuellen Gefäßen der EPO-Gruppe geringere Durchmesser sowie höhere Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten als in der Kontrollgruppe gemessen. Bei einer erhöhten Scherrate innerhalb eines Gefäßes werden reaktiv neue Gefäßsprossen gebildet, um den Gesamtdurchmesser des Gefäßsystems zu erhöhen und so die Scherrate wieder zu normalisieren [GALIE et al., 2014]. Auf diese Weise förderte die erhöhte Scherrate zusätzlich die Entwicklung neuer Blutgefäße in den Implantaten, die mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt waren.

Weiterhin wurde die Vaskularisierung der Implantate an Tag 14 immunhistochemisch untersucht. Dabei wiesen Integra®-Scaffolds, die mit Vehikel- oder EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, eine vergleichbare Dichte CD31-positiver Gefäße auf. Die Implantate beider Versuchsgruppen enthielten weiterhin 60 % GFP-positive Gefäße. Dies lässt darauf schließen, dass die präformierten GFP-positiven mikrovaskulären Fragmente entscheidend an dem Aufbau eines Gefäßnetzwerks innerhalb der Implantate beteiligt

waren. Außerdem wurde innerhalb des Granulationsgewebe, welches an die Implantate mit EPO-behandelten mikrovaskulären Fragmenten angrenzte, eine erhöhte Dichte CD31-positiver Gefäße gegenüber der Kontrollgruppe gefunden. Der Anteil GFP-positiver Gefäße war dabei zwischen den zwei Versuchsgruppen vergleichbar. Somit ist zum einen davon auszugehen, dass in der EPO-Gruppe mehr GFP-positive präformierte Gefäße aus den Integra[®]-Scaffolds aussprossen und zum anderen mehr GFP-negative Gefäße des Empfängergewebes in die Scaffolds einwuchsen. Die *in vivo* Ergebnisse deuten gemeinsam mit den Daten der Proteomanalyse darauf hin, dass die Behandlung mit EPO eine gesteigerte Sekretion pro-angiogener Faktoren durch die mikrovaskulären Fragmente induzierte. Die ausgeschütteten Proteine stimulierten das Wachstum GFP-positiver Fragmente aus den Implantaten hin zu GFP-negativen Gefäßen des Empfängergewebes und *vice versa*. Auf diese Weise könnte EPO die rasche Verbindung der mikrovaskulären Fragmente mit dem angrenzenden Empfängergewebe gefördert haben.

Zusammenfassend wurde im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass EPO sowohl die Viabilität als auch die proliferative und angiogene Aktivität mikrovaskulärer Fragmente verbessert. Zusätzlich stimuliert eine EPO-Behandlung mikrovaskulärer Fragmente die Bildung eines mikrovaskulären Netzwerks *in vivo*.

7.2.2.1. Klinische Perspektiven

Mikrovaskuläre Fragmente können aufgrund ihrer hohen Vaskularisierungskapazität zur Prävascularisierung von Implantaten genutzt werden. Die Entwicklung eines Fragment-basierten mikrovaskulären Netzwerks benötigt allerdings einige Tage [LASCHKE et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass die angiogene Aktivität mikrovaskulärer Fragmente durch die Vorbehandlung mit dem pro-angiogenem Zytokin EPO gesteigert werden kann.

In zukünftigen Studien könnte zusätzlich untersucht werden, ob auch eine EPO-Behandlung von weniger als 24 h einen positiven Einfluss auf mikrovaskuläre Fragmente hat. Diese können in der klinischen Praxis aufgrund von zeitintensiven Operationsverfahren gegebenenfalls nicht immer unmittelbar nach ihrer Isolierung in einen Gewebedefekt transferiert werden. In einer solchen Latenzphase könnte das

Aufbewahrungsmedium für die mikrovaskulären Fragmente mit EPO supplementiert werden. Dies wäre ein einfacher Ansatz, um die Effizienz eines solchen Verfahrens zukünftig noch deutlich zu verbessern.

Darüber hinaus ist es vor dem Hintergrund des ersten Abschnitts der vorliegenden Arbeit durchaus denkbar, dass EPO nicht nur die Anwendung frisch isolierter mikrovaskulärer Fragmente verbessert. So werden derzeit unterschiedliche Substanzen zur Inkubation von Geweben vor oder nach Kryokonservierung diskutiert. Beispielsweise kann durch die Inkubation mit Inhibitoren von Rho-assoziierten Proteinkinasen die Viabilität eines kryokonservierten Gewebes gesteigert werden [LI et al., 2009; SOLANAS et al., 2012]. Auch wenn experimentelle Studien zu einem solchen Einsatz von EPO bisher fehlen, könnte dieses Zytokin möglicherweise die Effizienz einer Kryokonservierung von mikrovaskulären Fragmenten weiter verbessern. Entsprechend wäre die Kombination einer EPO-Behandlung und einer Kryokonservierung eine Möglichkeit, die Erfolgsrate von Prävaskularisierungsstrategien mit mikrovaskulären Fragmenten zu verbessern und damit einen wichtigen Beitrag zum erfolgreichen Tissue Engineering der Zukunft zu liefern.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **AAPRO M, JELKMANN W, CONSTANTINESCU SN, LEYLAND-JONES B** (2012) Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *Br J Cancer* 106: 1249-1258
2. **ABDOLLAHI A, HAHNFELDT P, MAERCKER C, GRÖNE HJ, DEBUS J, ANSORGE W, FOLKMAN J, HLATKY L, HUBER PE** (2004) Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell* 13: 649-663
3. **ALGIRE GH** (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11
4. **ALURAL B, DURAN GA, TUFEKCI KU, ALLMER J, ONKAL Z, TUNALI D, GENC K, GENC S** (2014) EPO mediates neurotrophic, neuroprotective, anti-oxidant, and anti-apoptotic effects via downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y neuron-like cells. *Front Immunol* 5: 475
5. **BAHLMANN FH, DEGROOT K, DUCKERT T, NIEMCZYK E, BAHLMANN E, BOEHM SM, HALLER H, FLISER D** (2003) Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int* 64: 1648-1652
6. **BAKER M, WAYLAND H** (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143
7. **BARON VT, WELSH J, ABEDINPOUR P, BORGSTRÖM P** (2011) Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *Am J Cancer Res* 1: 674-686
8. **BELL RAV, MEGENEY LA** (2017) Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. *Cell Death Differ* 24: 1359-1368

9. **BROWN KE, HEYER K, RODRIGUEZ H, ESKANDARI MK, PEARCE WH, MORASCH MD** (2009) Arterial reconstruction with cryopreserved human allografts in the setting of infection: A single-center experience with midterm follow-up. *J Vasc Surg* 49: 660-666
10. **BURKE JF, YANNAS IV, QUINBY WC JR, BONDOC CC, JUNG WK** (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 194: 413-428
11. **CARMELIET P, JAIN RK** (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257
12. **CHAN BP, LEONG KW** (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 17: 467-479
13. **CHOI M, KWOK SJ, YUN SH** (2015) In vivo fluorescence microscopy: lessons from observing cell behavior in their native environment. *Physiology (Bethesda)* 30: 40-49
14. **CHOUDHERY MS, BADOWSKI M, MUISE A, PIERCE J, HARRIS DT** (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 12: 8
15. **CHOUDHERY MS, HARRIS DT** (2014) Cryopreservation can be used as an anti-aging strategy. *Cytotherapy* 16: 1771-1773
16. **COHEN J, GARRISI GJ, CONGEDO-FERRARA TA, KIECK KA, SCHIMMEL TW, SCOTT RT** (1997) Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 12: 994-1001
17. **COKIC BB, COKIC VP, SURESH S, WIRT S, NOGUCHI CT** (2014) Nitric oxide and hypoxia stimulate erythropoietin receptor via MAPK kinase in endothelial cells. *Microvasc Res* 92: 34-40

18. **DRUECKE D, LANGER S, LAMME E, PIEPER J, UGARKOVIC M, STEINAU HU, HOMANN HH** (2004) Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68: 10-18
19. **DUCHEYNE P, QIU Q** (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303
20. **DUTTENHOEFER F, LARA DE FREITAS R, MEURY T, LOIBL M, BENNEKER LM, RICHARDS RG, ALINI M, VERRIER S** (2013) 3D scaffolds co-seeded with human endothelial progenitor and mesenchymal stem cells: evidence of prevascularisation within 7 days. *Eur Cell Mater* 26: 49-64
21. **EHRBAR M, DJONOV VG, SCHNELL C, TSCHANZ SA, MARTINY-BARON G, SCHENK U, WOOD J, BURRI PH, HUBBELL JA, ZISCH AH** (2004) Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res* 94: 1124-1132
22. **ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K** (1980) Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134
23. **FANG C, WEN G, ZHANG L, LIN L, MOORE A, WU S, YE S, XIAO Q** (2013) An important role of matrix metalloproteinase-8 in angiogenesis in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 99: 146-155
24. **FAYE N, FOURNIER L, BALVAY D, THIAM R, ORLIAGUET G, CLÉMENT O, DEWACHTER P** (2012) Macromolecular capillary leakage is involved in the onset of anaphylactic hypotension. *Anesthesiology* 117: 1072-1079
25. **FISCHER HS, REIBEL NJ, BÜHRER C, DAME C** (2017) Prophylactic early erythropoietin for neuroprotection in preterm infants: a meta-analysis. *Pediatrics* 139: e20164317

26. **FOLKMAN J** (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29: 15-18
27. **FREYMAN TM, YANNAS IV, PEK YS, YOKOO R, GIBSON LJ** (2001) Micromechanics of fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Exp Cell Res* 269: 140-153
28. **FRIESENECKER B, TSAI AG, INSTAGLIETTA M** (1994) Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: H2204-2212
29. **FRUEH FS, SPÄTER T, LINDENBLATT N, CALCAGNI M, GIOVANOLI P, SCHEUER C, MENDER MD, LASCHKE MW** (2017) Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes. *J Invest Dermatol* 137: 217-227
30. **FULLER BJ** (2004) Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25: 375-388
31. **FUNK W, ENDRICH B, MESSMER K** (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186: 259-270
32. **GAFNI Y, ZILBERMAN Y, OPHIR Z, ABRAMOVITCH R, JAFFE M, GAZIT Z, DOMB A, GAZIT D** (2006) Design of a filamentous polymeric scaffold for in vivo guided angiogenesis. *Tissue Eng* 12: 3021-3034
33. **GALIE PA, NGUYEN DH, CHOI CK, COHEN DM, JANMEY PA, CHEN CS** (2014) Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7968-7973
34. **GAVINS FN, CHATTERJEE BE** (2004) Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49: 1-14

35. **GILLIS P, SAVLA U, VOLPERT OV, JIMENEZ B, WATERS CM, PANOS RJ, BOUCK NP** (1999) Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci* 112: 2049-2057
36. **GONG YY, XUE JX, ZHANG WJ, ZHOU GD, LIU W, CAO Y** (2011) A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials* 32: 2265-2273
37. **GRANATA R, TROVATO L, LUPIA E, SALA G, SETTANNI F, CAMUSSI G, GHIDONI R, GHIGO E** (2007) Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms. *J Thromb Haemost* 5: 835-845
38. **GRÄSSER C, SCHEUER C, PARAKENINGS J, TSCHERNIG T, EGLIN D, MENGER MD, LASCHKE MW** (2016) Effects of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) on the vascularisation of implanted polyurethane scaffolds seeded with microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 32: 74-86
39. **GUAN J, STANKUS JJ, WAGNER WR** (2007) Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *J Control Release* 120: 70-78
40. **HANAHAN D, FOLKMAN J** (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364
41. **HAYAT A, HARIA D, SALIFU MO** (2008) Erythropoietin stimulating agents in the management of anemia of chronic kidney disease. *Patient Prefer Adherence* 2: 195-200
42. **HIGGINS AZ, CULLEN DK, LAPLACA MC, KARLSSON JO** (2011) Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells. *J Neurosci Methods* 201: 9-16

43. **HISCOX AM, STONE AL, LIMESAND S, HOYING JB, WILLIAMS SK** (2008) An islet-stabilizing implant constructed using a preformed vasculature. *Tissue Eng Part A* 14: 433-440
44. **HOYING JB, BOSWELL CA, WILLIAMS SK** (1996) Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 409-419
45. **JADOUL P, GUILMAIN A, SQUIFFLET J, LUYCKX M, VOTINO R, WYNS C, DOLMANS MM** (2017) Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Hum Reprod* 32: 1046-1054
46. **JANSSEN FW, OOSTRA J, OORSCHOT AV, VAN BLITTERSWIJK CA** (2006) A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27: 315-323
47. **JAQUET K, KRAUSE K, TAWAKOL-KHODAI M, GEIDEL S, KUCK KH** (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 64: 326-333
48. **JELKMANN W** (2013) Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother* 40: 302-309
49. **KAIGLER D, WANG Z, HORGER K, MOONEY DJ, KREBSBACH PH** (2006) VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 21: 735-744
50. **KARLSSON JO, TONER M** (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17: 243-256
51. **KERTESZ N, WU J, CHEN TH, SUCOV HM, WU H** (2004) The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol* 276: 101-110

52. **KHATRI JJ, JOHNSON C, MAGID R, LESSNER SM, LAUDE KM, DIKALOV SI, HARRISON DG, SUNG HJ, RONG Y, GALIS ZS** (2004) Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation* 109: 520-525
53. **KIM WS, VACANTI CA, UPTON J, VACANTI JP** (1994) Bone defect repair with tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 94: 580-584
54. **KIM YW, BYZOVA TV** (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 123: 625-631
55. **KIMÁKOVÁ P, SOLÁR P, SOLÁROVÁ Z, KOMEL R, DEBELJAK N** (2017) Erythropoietin and its angiogenic activity. *Int J Mol Sci* 18: E1519
56. **KLYSCZ T, JÜNGER M, JUNG F, ZEINTL H** (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175
57. **KOKEMUELLER H, SPALTHOFF S, NOLFF M, TAVASSOL F, ESSIG H, STUEHMER C, BORMANN KH, RÜCKER M, GELLRICH NC** (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 379-387
58. **KREMER M, LANG E, BERGER AC** (2000) Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra artificial skin). *Br J Plast Surg* 53: 459-465
59. **LAMANUZZI A, SALTARELLA I, FERRUCCI A, RIA R, RUGGIERI S, RACANELLI V, RAO L, ANNESE T, NICO B, VACCA A, RIBATTI D** (2016) Role of erythropoietin in the angiogenic activity of bone marrow endothelial cells of MGUS and multiple myeloma patients. *Oncotarget* 7: 14510-14521
60. **LANGER R, VACANTI JP** (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926

61. **LAROCHE V, MCKENNA DH, MOROFF G, SCHIERMAN T, KADIDLO D, MCCULLOUGH J** (2005) Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion* 45: 1909-1916
62. **LASCHKE MW, HARDER Y, AMON M, MARTIN I, FARHADI J, RING A, TORIO-PADRON N, SCHRAMM R, RÜCKER M, JUNKER D, HÄUFEL JM, CARVALHO C, HEBERER M, GERMANN G, VOLLMAR B, MENGER MD** (2006) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104
63. **LASCHKE MW, RÜCKER M, JENSEN G, CARVALHO C, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENGER MD** (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-948
64. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENGER MD** (2009) Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-465
65. **LASCHKE MW, MUSSAWY H, SCHULER S, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD** (2010) Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20: 356-366
66. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENGER MD** (2011) The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22: 147-164
67. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2012) Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48: 85-92
68. **LASCHKE MW, KLEER S, SCHEUER C, SCHULER S, GARCIA P, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD** (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24: 266-277

69. **LASCHKE MW, VORSTERMAN VAN OIJEN AE, KÖRBEL C, SCHEUER C, MENGER MD** (2013) 4-hydroxybenzyl alcohol: a novel inhibitor of tumor angiogenesis and growth. *Life Sci* 93: 44-50
70. **LASCHKE MW, GRÄSSER C, KLEER S, SCHEUER C, EGLIN D, ALINI M, MENGER MD** (2014) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater* 28: 287-298
71. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2015) Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 33: 442-448
72. **LASCHKE MW, MENGER MD** (2016) Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol Adv* 34: 112-121
73. **LASCHKE MW, AUGUSTIN VA, SAHIN F, ANSCHÜTZ D, METZGER W, SCHEUER C, BISCHOFF M, AKTAS C, MENGER MD** (2016) Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor[®]) implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104: 1738-1748
74. **LEHR HA, LEUNIG M, MENGER MD, NOLTE D, MESSMER K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062
75. **LEY CD, OLSEN MW, LUND EL, KRISTJANSEN PE** (2004) Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay. *Microvasc Res* 68: 161-168
76. **LI X, KRAWETZ R, LIU S, MENG G, RANCOURT DE** (2009) ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 24: 580-589

77. **LOVELOCK JE** (1953) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10: 414-426
78. **LOW-MARCHELLI JM, ARDI VC, VIZCARRA EA, VAN ROOIJEN N, QUIGLEY JP, YANG J** (2013) Twist1 induces CCL2 and recruits macrophages to promote angiogenesis. *Cancer Res* 73: 662-671
79. **MALVEZZI L, CASTRONUOVO JJ JR, SWAYNE LC, CONE D, TRIVINO JZ** (1992) The correlation between three methods of skin perfusion pressure measurement: radionuclide washout, laser Doppler flow, and photoplethysmography. *J Vasc Surg* 15: 823-829
80. **MANDUMPAL JB, KRECK CA, MANCERA RL** (2011) A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Phys Chem Chem Phys* 13: 3839-3842
81. **MARIJNISSEN WJ, VAN OSCH GJ, AIGNER J, VAN DER VEEN SW, HOLLANDER AP, VERWOERD-VERHOEF HL, VERHAAR JA** (2002) Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23: 1511-1517
82. **MARQUES PE, OLIVEIRA AG, CHANG L, PAULA-NETO HA, MENEZES GB** (2015) Understanding liver immunology using intravital microscopy. *J Hepatol* 63: 733-742
83. **MARQUEZ-CURTIS LA, JANOWSKA-WIECZOREK A, MCGANN LE, ELLIOTT JA** (2015) Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 71: 181-197
84. **MAZUR P** (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47: 347-369

85. **McDANIEL JS, PILIA M, WARD CL, POLLOT BE, RATHBONE CR** (2014) Characterization and multilineage potential of cells derived from isolated microvascular fragments. *J Surg Res* 192: 214-222
86. **McVICAR CM, COLHOUN LM, ABRAHAMS JL, KITSON CL, HAMILTON R, MEDINA RJ, DURGA D, GARDINER TA, RUDD PM, STITT AW** (2010) Differential modulation of angiogenesis by erythropoiesis-stimulating agents in a mouse model of ischaemic retinopathy. *PLoS One* 5: e11870
87. **MENGER MD, LASCHKE MW, 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
88. **MERYMAN HT** (1971) Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8: 173-183
89. **MIRANDA PM, MOHAN V, GANTHIMATHY S, ANJANA RM, GUNASEKARAN S, THIAGARAJAN V, CHURCHILL TA, KIN T, SHAPIRO AM, LAKEY JR** (2013) Human islet mass, morphology, and survival after cryopreservation using the Edmonton protocol. *Islets* 5: 188-195
90. **MIYAKE M, GOODISON S, URQUIDI V, GOMES GIACOIA E, ROSSER CJ** (2013) Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Lab Invest* 93: 768-778
91. **M-REBOREDO N, DÍAZ A, CASTRO A, VILLAESCUSA RG** (2000) Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26: 1263-1270
92. **MURPHY CM, HAUGH MG, O'BRIEN FJ** (2010) The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31: 461-466

93. **NAKAMURA R, SENE A, SANTEFORD A, GDOURA A, KUBOTA S, ZAPATA N, APTE RS** (2015) IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat Commun* 6: 7847
94. **NAKANO M, NAKAJIMA Y, KUDO S, TSUCHIDA Y, NAKAMURA H, FUKUDA O** (1998) Effect of autotransplantation of microvessel fragments on experimental random-pattern flaps in the rat. *Eur Surg Res* 30: 149-160
95. **NAKANO M, NAKAJIMA Y, KUDO S, TSUCHIDA Y, NAKAMURA H, FUKUDA O** (1999) Successful autotransplantation of microvessel fragments into the rat heart. *Eur Surg Res* 31: 240-248
96. **O'BRIEN FJ** (2011) Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 14: 88-95
97. **OKABE M, IKAWA M, KOMINAMI K, NAKANISHI T, NISHIMUNE Y** (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319
98. **O'NEILL CL, GUDURIC-FUCHS J, CHAMBERS SE, O'DOHERTY M, BOTTAZZI B, STITT AW, MEDINA RJ** (2016) Endothelial cell-derived pentraxin 3 limits the vasoreparative therapeutic potential of circulating angiogenic cells. *Cardiovasc Res* 112: 677-688
99. **ONOFRE J, BAERT Y, FAES K, GOOSSENS E** (2016) Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update* 22: 744-761
100. **O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS, FLYNN E, BIRKHEAD JR, OLSEN BR, FOLKMAN J** (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285

101. **PALMER GM, FONTANELLA AN, SHAN S, HANNA G, ZHANG G, FRASER CL, DEWHIRST MW** (2011) In vivo optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters. *Nat Protoc* 6: 1355-1366
102. **PAPENFUSS HD, GROSS JF, INTAGLIETTA M, TREESE FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318
103. **PEGG DE** (2007) Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 368: 39-57
104. **PILIA M, McDANIEL JS, GUDA T, CHEN XK, RHOADS RP, ALLEN RE, CORONA BT, RATHBONE CR** (2014) Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater* 28: 11-23
105. **RAINVILLE N, JACHIMOWICZ E, WOJCHOWSKI DM** (2016) Targeting EPO and EPO receptor pathways in anemia and dysregulated erythropoiesis. *Expert Opin Ther Targets* 20: 287-301
106. **RAYA-RIVERA AM, ESQUILIANO D, FIERRO-PASTRANA R, LÓPEZ-BAYGHEN E, VALENCIA P, ORDORICA-FLORES R, SOKER S, YOO JJ, ATALA A** (2014) Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet* 384: 329-336
107. **REED MW, MILLER FN** (1988) Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36: 104-107
108. **REN LL, MA DY, FENG X, MAO TQ, LIU YP, DING Y** (2008) A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop. *Med Hypotheses* 71: 737-740

109. **RIBATTI D, PRESTA M, VACCA A, RIA R, GIULIANI R, DELL'ERA P, NICO B, RONCALI L, DAMMACCO F** (1999) Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93: 2627-2636
110. **RISBUD M, RINGE J, BHONDE R, SITTINGER M** (2001) In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant* 10: 755-763
111. **ROUWKEMA J, DE BOER J, VAN BLITTERSWIJK CA** (2006) Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12: 2685-2693
112. **RÜCKER M, LASCHKE MW, JUNKER D, CARVALHO C, SCHRAMM A, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENGER MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038
113. **RUMBAUT RE, BELLERA RV, RANDHAWA JK, SHRIMPTON CN, DASGUPTA SK, DONG JF, BURNS AR** (2006) Endotoxin enhances microvascular thrombosis in mouse cremaster venules via a TLR4-dependent, neutrophil-independent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1671-1679
114. **RUTHERFORD CJ, SCHNEIDER TJ, DEMPSEY H, KIRN DH, BRUGNARA C, GOLDBERG MA** (1994) Efficacy of different dosing regimens for recombinant human erythropoietin in a simulated perisurgical setting: the importance of iron availability in optimizing response. *Am J Med* 96: 139-145
115. **RYU J, LEE CW, HONG KH, SHIN JA, LIM SH, PARK CS, SHIM J, NAM KB, CHOI KJ, KIM YH, HAN KH** (2008) Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res* 78: 333-340

116. **SAETZLER RK, JALLO J, LEHR HA, PHILIPS CM, VASTHARE U, ARFORS KE, TUMA RF** (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513
117. **SANDISON JC** (1924) A new method for the study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28: 281-287
118. **SCHANTZ JT, CHIM H, WHITEMAN M** (2007) Cell guidance in tissue engineering: SDF-1 mediates site-directed homing of mesenchymal stem cells within three-dimensional polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng* 13: 2615-2624
119. **SCHECHNER JS, NATH AK, ZHENG L, KLUGER MS, HUGHES CC, SIERRA-HONIGMANN MR, LORBER MI, TELLIDES G, KASHGARIAN M, BOTHWELL AL, POBER JS** (2000) In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9191-9196
120. **SCHOLZEN T, GERDES J** (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322
121. **SEKIYA S, SHIMIZU T, OKANO T** (2013) Vascularization in 3D tissue using cell sheet technology. *Regen Med* 8: 371-377
122. **SETHI S, HERRMANN M, ROLLER J, VON MÜLLER L, PEERSCHKE EI, GHEBREHIWET B, BAJRIC I, MENGER MD, LASCHKE MW** (2011) Blockade of gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of *Staphylococcus aureus* to the microvascular endothelium. *Microvasc Res* 82: 66-72
123. **SHAHROKHI S, ARNO A, JESCHKE MG** (2014) The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase. *Wound Repair Regen* 22: 14-22

124. **SHEPHERD BR, CHEN HY, SMITH CM, GRUIONU G, WILLIAMS SK, HOYING JB** (2004) Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904
125. **SHEPHERD BR, HOYING JB, WILLIAMS SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng* 13: 2871-2879
126. **SIKAVITSAS VI, VAN DEN DOLDER J, BANCROFT GN, JANSEN JA, MIKOS AG** (2003) Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *J Biomed Mater Res* 67: 944-951
127. **SOCOLOVSKY M, NAM H, FLEMING MD, HAASE VH, BRUGNARA C, LODISH HF** (2001) Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98: 3261-3273
128. **SOLANAS E, SOSTRES C, SERRABLO A, GARCÍA-GIL A, ARANGUREN F, JIMENEZ P, SERRANO MT** (2012) Incubation with dimethyl sulfoxide prior to cryopreservation improves functionality of thawed human primary hepatocytes. *Biopreserv Biobank* 10: 446-453
129. **SONG YC, PEGG DE, HUNT CJ** (1995) Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: optimization of dimethyl sulfoxide concentration and cooling rate. *Cryobiology* 32: 405-421
130. **SORG H, KRUEGER C, SCHULZ T, MENGER MD, SCHMITZ F, VOLLMAR B** (2009) Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *FASEB J* 23: 3049-3058
131. **SPÄTER T, FRUEH FS, MENGER MD, LASCHKE MW** (2017) Potentials and limitations of Integra[®] flowable wound matrix seeded with adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 33: 268-278

132. **STEINBAUER M, HARRIS AG, ABELS C, MESSMER K** (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298
133. **STERN R, MCPHERSON M, LONGAKER MT** (1990) Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 11: 7-13
134. **STREIT M, RICCARDI L, VELASCO P, BROWN LF, HAWIGHORST T, BORNSTEIN P, DETMAR M** (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14888-14893
135. **STRÜDER D, GRAMBOW E, KLAR E, MLYNSKI R, VOLLMAR B** (2017) Intravital microscopy and thrombus induction in the earlobe of a hairless mouse. *J Vis Exp* (122)
136. **SULTANI AB, MARQUEZ-CURTIS LA, ELLIOTT JA, MCGANN LE** (2016) Improved cryopreservation of human umbilical vein endothelial cells: a systematic approach. *Sci Rep* 6: 34393
137. **TAKEHARA H, OHTA Y, MOTOYAMA M, HARUTA M, NAGASAKI M, TAKEHARA H, NODA T, SASAGAWA K, TOKUDA T, OHTA J** (2015) Intravital fluorescence imaging of mouse brain using implantable semiconductor devices and epi-illumination of biological tissue. *Biomed Opt Express* 6: 1553-1564
138. **TATONE C, DI EMIDIO G, VENTO M, CIRIMINNA R, ARTINI PG** (2010) Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol* 26: 563-567
139. **TATTERSALL IW, DU J, CONG Z, CHO BS, KLEIN AM, DIECK CL, CHAUDHRI RA, CUERVO H, HERTS JH, KITAJEWSKI J** (2016) In vitro modeling of endothelial interaction with macrophages and pericytes demonstrates Notch signaling function in the vascular microenvironment. *Angiogenesis* 19: 201-215

140. **TAVASSOL F, KAMPMANN A, SCHUMANN P, LINDHORST D, KOKEMÜLLER H, ESSIG H, MEEMKEN JH, RÜCKER M, GELLRICH NC** (2011) A novel approach for studying microcirculation in bone defects by intravital fluorescence microscopy. *Tissue Eng Part C Methods* 17: 1151-1159
141. **UTZINGER U, BAGGETT B, WEISS JA, HOYING JB, EDGAR LT** (2015) Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis* 18: 219-232
142. **VAJKOCZY P, SCHILLING L, ULLRICH A, SCHMIEDEK P, MENGER MD** (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520
143. **VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENGER MD** (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2: 53-61
144. **VAN CRUIJSEN H, GIACCONE G, HOEKMAN K** (2005) Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer* 117: 883-888
145. **WANG Q, GORBAY S, PFISTER F, HÖGER S, DORN-BEINEKE A, KRÜGEL K, BERRONE E, WU L, KORFF T, LIN J, BUSCH S, REICHENBACH A, FENG Y, HAMMES HP** (2011) Long-term treatment with suberythropoietic Epo is vaso- and neuroprotective in experimental diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 27: 769-782
146. **WARREN JS, ZHAO Y, YUNG R, DESAI A** (2011) Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 424-433

147. **WATANABE D, SUZUMA K, MATSUI S, KURIMOTO M, KIRYU J, KITA M, SUZUMA I, OHASHI H, OJIMA T, MURAKAMI T, KOBAYASHI T, MASUDA S, NAGAO M, YOSHIMURA N, TAKAGI H** (2005) Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 353: 782-792

148. **WEISSMANN N, KUZKAYA N, FUCHS B, TIYERILI V, SCHÄFER RU, SCHÜTTE H, GHOFRANI HA, SCHERMULY RT, SCHUDT C, SYDYKOV A, EGEMNAZAROW B, SEEGER W, GRIMMINGER F** (2005) Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir Res* 6: 86

149. **WITTHUHN BA, QUELLE FW, SILVENNOINEN O, YI T, TANG B, MIURA O, IHLE JN** (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74: 227-236

150. **WOODS EJ, THIRUMALA S, BADHE-BUCHANAN SS, CLARKE D, MATHEW AJ** (2016) Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytotherapy* 18: 697-711

151. **XUE Y, PETROVIC N, CAO R, LARSSON O, LIM S, CHEN S, FELDMANN HM, LIANG Z, ZHU Z, NEDERGAARD J, CANNON B, CAO Y** (2009) Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 9: 99-109

152. **YUAN C, GAO J, GUO J, BAI L, MARSHALL C, CAI Z, WANG L, XIAO M** (2014) Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS One* 9: e107447

153. **ZWEZDARYK KJ, COFFELT SB, FIGUEROA YG, LIU J, PHINNEY DG, LAMARCA HL, FLOREZ L, MORRIS CB, HOYLE GW, SCANDURRO AB** (2007) Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 35: 640-652

-
154. **ZWISSLER B, SCHOSSER R, WEISS C, IBER V, WEISS M, SCHWICKERT C, SPENGLER P, MESSMER K** (1991) Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med (Berl)* 191: 47-63

9. DANKSAGUNG

Auf diesem Weg möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger und Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke für die Überlassung des faszinierenden Themas und die Möglichkeit, dieses am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bearbeiten zu dürfen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Matthias W. Laschke, der durch seine persönliche Anleitung, unermüdlige Hilfsbereitschaft und konstruktiven Ratschläge größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat. Sein Enthusiasmus für die Wissenschaft, die herausragende Kompetenz, der Perfektionismus und die fruchtbaren Diskussionen mit ihm werden mir stets in bester Erinnerung bleiben und haben mein wissenschaftliches Interesse weiter gefördert.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Metzger möchte ich mich für das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings, Frau Janine Becker, Frau Ruth Nickels und Frau Elisabeth Gluding, die mir großartig bei der Durchführung der *in vitro* Versuche, der Herstellung histologischer Präparate und der Betreuung unserer Versuchstiere zur Seite standen. Meinen Kollegen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie danke ich für das fruchtbare und freundschaftliche Arbeitsklima.

Schließlich möchte ich ganz persönlich meiner großen und kleinen Familie danken, die diesen langen Weg immer mit mir gegangen ist und mich fortwährend mit ihrer Liebe unterstützt hat.

10. LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version der Arbeit nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version der Arbeit nicht enthalten.

11. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

11.1. Originalarbeiten aus der vorliegenden Dissertation

LASCHKE MW, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, HEß A, METZGER W, MENGER MD (2018) Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 12: 1020-1030

KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEß A, SPÄTER T, MENGER MD, LASCHKE MW (2018) Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 35: 268-280

11.2. Weitere Originalarbeiten

SPÄTER T, FRUEH FS, **KARSCHNIA P**, MENGER MD, LASCHKE MW (2018) Enoxaparin does not affect network formation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Wound Repair Regen* 26: 36-45

KARSCHNIA P, FULBRIGHT RK, LAURANS MS, BARBIERO FJ, HUTTNER AJ, BAEHRING JM (2018) Clinical Reasoning: A 58-year old woman with systemic scleroderma and progressive cervical cord compression. *Neurology* 91: e1262-e1264

LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, **KARSCHNIA P**, MENGER MD (2019) Subnormothermic short-term cultivation improves the vascularization capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 13: 131-142

KARSCHNIA P, FULBRIGHT RK, BAEHRING JM (2019) Vertebral artery loop in a case of recurrent transient global amnesia. *J Neurol Sci* 396: 213-215

KARSCHNIA P, SENGUPTA S, DIETRICH J (2019) MRI findings in trigeminal neuropathy: bilateral Meckel's cave lesions. *Acta Neurol Belg*, in press

KARSCHNIA P, JORDAN JT, FORST DA, ARILLAGA-ROMANY IC, BATCHELOR TT, BAEHRING JM, CLEMENT NF, GONZALEZ CASTRO NL, HERLOPIAN A, MAUS MV, SCHWAIBLMAIR MH, SOUMERAI JD, TAKVORIAN RW, HOCHBERG EP, BARNES JA, ABRAMSON JS, FRIGAULT MJ, DIETRICH J (2019) Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T-cells. *Blood*, in press

KARSCHNIA P, BARBIERO FJ, SCHWAIBLMAIR MH, PIEPMEIER JM, HUTTNER AJ, BECKER KP, FULBRIGHT RK, BAEHRING JM (2019) Leptomeningeal dissemination from low-grade neuroepithelial CNS tumors in adults: a 15-year experience. *Neuroonc Pract*, in press

LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, **KARSCHNIA P**, KONTAXI E, MENGER MD (2019) University of Wisconsin solution is suitable for the xeno-free short-term storage of adipose-tissue derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater*, under review

KAULEN LD, GALLUZZO D, HUI P, BARBIERO F, **KARSCHNIA P**, Huttner AJ, FULBRIGHT RK, BAEHRING JM (2019) Prognostic markers for primary central nervous system lymphoma in immunocompromised hosts. *J Neurol Sci*, under review

11.3. Übersichtsarbeiten

DIEDERICH S, BARTSCH L*, BERKMANN JC*, FRÖSE K*, HEITMANN J*, HOPPE C*, IGGENA D*, JAZMATI D*, **KARSCHNIA P***, LINSSENMEIER M*, MAULHARDT T*, MÖHRMANN L*, MORSTEIN J*, PAFFENHOLZ SV*, RÖPENACK P*, RÜCKERT T*, SANDIG L*, SCHELL M*, STEINMANN A*, VOSS G*, WASMUTH J*, WEINBERGER ME*, WULLENKORD R* (2016) The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol Med* 8: 442-457

*geteilte Ko-Autorenschaft

DURAN D, **KARSCHNIA P**, GAILLARD JR, KARIMY JK, YOUNGBLOOD MW, DiLUNA ML, MATOUK CC, AAGAARD-KIENITZ B, SMITH ER, ORBACH DB, RODESCH G, BERENSTEIN A, GUNEL M, KAHLE KT (2018) Human genetics and molecular mechanisms of Vein of Galen malformation. *J Neurosurg Pediatr* 21: 367-374

KARSCHNIA P, NISHIMURA S, LOUVI A (2019) Cerebrovascular disorders associated with genetic lesions. *Cell Mol Life Sci*, 76: 283-300

KARSCHNIA P, PARSONS MW, DIETRICH J (2019) Pharmacologic management of cancer therapy-induced cognitive impairment. *Lancet Oncol* 20: e92-e102

11.4. Zitierfähige Abstracts und Kongressbeiträge

KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEß A, METZGER W, MENDER MD, LASCHKE MW (2016) Cryopreservation does not affect the vascularization capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 57: 322

HEß A, SCHEUER C, **KARSCHNIA P**, MENDER MD, LASCHKE MW (2016) Subnormothermic short-term culture improves the in vivo vascularization capacity of adipose-tissue derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 57: 323

HEß A, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, MENDER MD, LASCHKE MW (2017) Adipose tissue-derived microvascular fragments exhibit an improved vascularization capacity after subnormothermic short-term culture. *Eur Surg Res* 58: 47

KARSCHNIA P, HEß A, SCHEUER C, METZGER W, MENDER MD, LASCHKE MW (2017) The vascularization potential of adipose tissue-derived microvascular fragments is not affected by cryopreservation. *Eur Surg Res* 58: 48

HEß A, SCHEUER C, **KARSCHNIA P**, MENDER MD, LASCHKE MW (2017) University of Wisconsin solution is suitable for the short-term culture of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 58: 322

KONTAXI E, HEß A, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, MENGER MD, LASCHKE MW (2017) Insulin-like growth factor (IGF)-1 signaling regulates the angiogenic activity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 58: 321

KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEß A, MENGER MD, LASCHKE MW (2017) Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 58: 324

KONTAXI E, HEß A, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, MENGER MD, LASCHKE MW (2018) Insulin-like growth factor (IGF)-1 stimulates the angiogenic activity of adipose tissue-derived microvascular fragments for tissue engineering. *Eur Surg Res* 59: 41

HEß A, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, MENGER MD, LASCHKE MW (2018) Short-term culture in University of Wisconsin solution maintains the vascularization capacity of adipose-tissue derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 59: 41

KARSCHNIA P, BARBIERO FJ, SCHWAIBLMAIR MH, PIEPMEIER JM, HUTTNER AJ, BECKER KP, FULBRIGHT RK, BAEHRING JM (2018) Leptomeningeal dissemination from low-grade neuroepithelial CNS tumors in adults: a 15-year experience. *Neurology* 90: P6.159

KARSCHNIA P, ERSON-OMAY EZ, HUTTNER AJ, FULBRIGHT RK, GÜNEL M, BAEHRING JM (2018) Genomic profile of tumorigenesis in a patient with Turcot syndrome. *Neuro Oncol* 20: iii293

11.5. Cover page

Cover page, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine Vol. 12 (4), 2018



REM-Aufnahmen von frisch isolierten mikrovaskulären Fragmenten auf der Oberfläche eines Integra®-Scaffolds. Erschienen im Rahmen der Publikation:

LASCHKE MW, **KARSCHNIA P**, SCHEUER C, HEß A, METZGER W, MENGER MD (2018)
Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 12: 1020-1030