

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

**STIMULATION DER ANGIOGENEN AKTIVITÄT  
MIKROVASKULÄRER FRAGMENTE AUS FETTGEWEBE  
MIT INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR (IGF)-1**

*Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2023

vorgelegt von Elena Kontaxi

geboren am 11.06.1994 in Karlsruhe

*Meinem Großvater Herrn Dr. Gerhard Rösler*

Tag der Promotion: 02.07.2024

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias W. Laschke  
Prof. Dr. Henning Madry

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1 Tissue Engineering .....	5
3.2 Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten .....	10
3.3 Metabolische Aktivierung mikrovaskulärer Fragmente .....	12
3.4 Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente .....	17
<b>4. ZIEL DER STUDIE .....</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>22</b>
5.1 Versuchstiere .....	22
5.2 Mikrovaskuläre Fragmente .....	23
5.2.1 Isolierung .....	23
5.2.2 Kultivierung .....	25
5.2.3 Kryokonservierung .....	26
5.3 <i>In vitro</i> Analysen .....	27
5.3.1 Durchflusszytometrie .....	27
5.3.2 Western Blot .....	27
5.3.2.1 Proteinextraktion .....	28
5.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
5.3.2.3 Proteintransfer .....	30
5.3.2.4 Proteindetektion und quantitative Auswertung .....	30
5.4 Herstellung prävaskularisierter Scaffolds .....	31
5.4.1 Prozessierung der Scaffolds .....	31
5.4.2 Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten .....	32
5.5 Modell der Rückenhautkammer .....	32
5.5.1 Präparation der Rückenhautkammer .....	32
5.5.2 Implantation prävaskularisierter Scaffolds .....	35

<b>5.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>36</b>
5.6.1 Mikrozirkulatorische Analysen	38
5.6.1.1 Perfundierte ROIs	39
5.6.1.2 Funktionelle Kapillardichte	39
5.6.1.3 Gefäßdurchmesser	40
5.6.1.4 Blutzellgeschwindigkeit	40
5.6.1.5 Scherrate	41
5.6.2 Abschluss der <i>in vivo</i> Untersuchungen	41
<b>5.7 Histologie und Immunhistochemie</b>	<b>41</b>
5.7.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	42
5.7.2 Sirius Red-Färbung	42
5.7.3 CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung	43
5.7.4 CD31-Caspase (Casp)-3- und CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung	44
<b>5.8 Experimentelles Protokoll</b>	<b>45</b>
5.8.1 <i>In vitro</i> Versuchsgruppen	45
5.8.2 <i>In vivo</i> Versuchsgruppen	45
5.8.3 Versuchsablauf	47
<b>5.9 Statistik</b>	<b>48</b>
 <b>6. ERGEBNISSE</b>	 <b>49</b>
6.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	49
6.2 IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente	50
6.2.1 <i>In vitro</i> Analysen	50
6.2.1.1 Zelluläre Zusammensetzung	50
6.2.1.2 Pro-angiogene Aktivität	51
6.2.1.3 Viabilität und Proliferation	52
6.2.2 <i>In vivo</i> Analysen	53
6.2.2.1 Vaskularisierung der implantierten Scaffolds	53
6.2.2.2 Mikrohämodynamik	55
6.2.2.3 Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds	56
6.3 Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente	59
6.3.1 <i>In vivo</i> Analysen	59
6.3.1.1 Vaskularisierung der implantierten Scaffolds	59
6.3.1.2 Mikrohämodynamik	61
6.3.1.3 Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds	63
6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	66

---

<b>7.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
7.1	Diskussion von Material und Methodik .....	68
7.1.1	Rückenhautkammermodell .....	68
7.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	70
7.2	Diskussion der Ergebnisse .....	72
7.2.1	IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente .....	72
	7.2.1.1 Klinische Perspektiven .....	77
7.2.2	Präkultivierung und Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente .....	78
	7.2.2.1 Klinische Perspektiven .....	83
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>106</b>
<b>11.</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>108</b>
11.1	Originalarbeit aus der vorliegenden Dissertation .....	108
11.2	Weitere Originalarbeiten .....	108
11.3	Zitierfähige Abstracts .....	108

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Tissue Engineering ist ein Teilgebiet der Regenerativen Medizin und befasst sich mit der Generierung von Ersatzgeweben. Hierzu werden unterschiedliche Biomaterialien, sogenannte Scaffolds, mit Zellen besiedelt. Diese Konstrukte können anschließend in den Körper implantiert werden. Dabei ist eine ausreichende Vaskularisierung der Implantate eine wichtige Voraussetzung, um ihr Überleben und ihre Funktion zu garantieren. Diese kann durch die Prävaskularisierung von Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten aus Fettgewebe erzielt werden. Nach Implantation finden die Gefäßfragmente über Inoskulation Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängers. Bis zur vollständigen Vaskularisierung der Implantate vergehen jedoch immer noch einige Tage. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit bestimmte Strategien den Vaskularisierungsprozess beschleunigen können.

Die Angiogenese im Fettgewebe wird durch den insulin-like growth factor (IGF)-1 Signalweg stimuliert. Aus diesem Grund wurde **im ersten Studienabschnitt** dieser Arbeit analysiert, ob durch Aktivierung dieses Signalwegs auch das Vaskularisierungspotential von Gefäßfragmenten aus Fettgewebe gesteigert werden kann. Zu diesem Zweck wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem Nebenhodenfett von Spendermäusen isoliert und für 24 h bei 4 °C in University-of-Wisconsin (UW)-Lösung kultiviert. Dabei war die Lösung entweder mit Vehikel, 1µM IGF-1 oder einer Kombination aus 1µM IGF-1 und 0,5 µg/ml insulin-like growth factor binding protein (IGFbp)4 supplementiert. IGFbp4 verhindert dabei über eine nicht-kompetitive Hemmung von IGF-1 die Aktivierung des IGF-1 Signalwegs. Anschließend wurde die zelluläre Zusammensetzung der Fragmente sowie ihre Viabilität, Proliferation und Expression pro-angiogener Faktoren *in vitro* bestimmt. Zusätzlich wurden präkultivierte Gefäßfragmente auf Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrizes gesiedelt, welche in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen implantiert wurden, um ihre Vaskularisierung und Inkorporation *in vivo* über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum intravitalmikroskopisch sowie histologisch und immunhistochemisch zu analysieren.

Die Kultivierung der mikrovaskulären Fragmente mit IGF-1 führte zu einer Verbesserung ihrer Viabilität und einer vermehrten Expression pro-angiogener

Faktoren, ohne ihre zelluläre Zusammensetzung und Proliferation zu beeinflussen. Dementsprechend zeigten Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt wurden, eine verbesserte *in vivo* Vaskularisierung im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen. Diese pro-angiogene Wirkung *in vivo* wurde durch die zusätzliche Exposition der mikrovaskulären Fragmente gegenüber IGFbp4 aufgehoben. Dies zeigt, dass eine Stimulation mit IGF-1 eine vielversprechende Strategie darstellt, um das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente zu steigern.

**Im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob das hohe Vaskularisierungspotential von IGF-1-stimulierten Gefäßfragmenten nach Kryokonservierung erhalten bleibt und somit auch nach einer Langzeitlagerung der Fragmente genutzt werden kann. Hierfür wurden mikrovaskuläre Fragmente erneut für 24 h bei 4 °C in UW-Lösung kultiviert, die mit IGF-1 supplementiert war. Anschließend wurden die Gefäßfragmente entweder direkt (Kontrolle) oder nach einer 7-tägigen Kryokonservierung bei -196 °C auf Scaffolds transferiert, welche in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen implantiert wurden. Die Vaskularisierung der Implantate wurde *in vivo* mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie sowie histologischen und immunhistochemischen Techniken über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum untersucht.

Die Kryokonservierung der präkultivierten Gefäße führte zu einer langsameren Vaskularisierung der implantierten Scaffolds und zu einem verzögerten Reifungsprozess der einzelnen Blutgefäße. Dementsprechend wurde am Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums ein geringerer Anteil an Gefäßen innerhalb sowie im umgebenden Rückenhautkammergebe der Scaffolds nachgewiesen, die mit kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt worden waren. Daraus kann geschlossen werden, dass das Vaskularisierungspotential von IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten durch eine Kryokonservierung stark beeinträchtigt wird. Eine vergleichbare Vaskularisierung der Scaffolds, wie durch IGF1-stimulierte, nicht-kryokonservierte Gefäßfragmente, kann nicht erreicht werden.



## 2. SUMMARY

Tissue Engineering is a part of regenerative medicine focusing on the generation of tissue substitutes. For this purpose different biomaterials, referred to as scaffolds, are seeded with cells. Subsequently, these constructs can be implanted into the body. A sufficient vascularization of the implants is a crucial determinant for their survival and the maintenance of their function. This can be achieved by the prevascularization of scaffolds with microvascular fragments from adipose tissue. After implantation microvascular fragments develop interconnections to the host vasculature by inosculation. However, the implants still require several days for complete vascularization. Hence, in the present thesis strategies were examined that may accelerate the process of vascularization.

Angiogenesis of adipose tissue is stimulated by the insulin-like growth factor (IGF)-1 signaling pathway. Accordingly, in **the first part** of the present thesis it was analyzed whether the activation of this pathway leads to an increased vascularization potential of adipose tissue-derived microvascular fragments. For this purpose, microvascular fragments were isolated from the epididymal fat pads of donor mice and cultivated for 24 h in 4 °C University-of-Wisconsin (UW)-solution. The solution was either supplemented with vehicle, 1µM IGF-1 or a combination of 1µM IGF-1 and 0.5 µg/ml insulin-like growth factor binding protein (IGFbp)4. Thereby IGFbp4 inhibits the IGF-1 signaling pathway by a non-competitive inhibition of IGF-1. Thereafter, the cellular composition of the microvascular fragments as well as their viability, proliferation and growth factor expression were determined *in vitro*. Additionally, pre-cultivated microvascular fragments were seeded onto collagen-glycosaminoglycan matrices, which were implanted into the dorsal skinfold chambers of C57BL/6 mice to analyze *in vivo* their vascularization and incorporation over a 14-days observation period by means of intravital fluorescence microscopy as well as histology and immunohistochemistry.

The cultivation of microvascular fragments with IGF-1 improved their viability and upregulated their expression of pro-angiogenic factors without affecting their cellular composition and proliferation. Accordingly, scaffolds seeded with IGF-1-stimulated microvascular fragments exhibited an enhanced *in vivo* vascularization

when compared to vehicle-treated controls. This pro-angiogenic effect *in vivo* was reversed by additional exposure of the microvascular fragments to IGFbp4. These findings indicate that IGF-1-stimulation represents a promising strategy to improve the vascularization capacity of microvascular fragments.

In the **second part** of the present thesis it was analyzed whether the high vascularization capacity of IGF-1-stimulated microvascular fragments can be maintained during cryopreservation and, therefore, may be even beneficial after long-term storage of microvascular fragments. For this purpose, microvascular fragments were cultivated again for 24 h in 4 °C UW solution supplemented with IGF-1. Subsequently, the microvascular fragments were either directly transferred (control) or after being cryopreserved at -196 °C for 7 days onto scaffolds, which were implanted into the dorsal skinfold chambers of C57BL/6 mice. The vascularization of the implants was assessed by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry over a 14-days observation period.

The cryopreservation of pre-cultivated microvascular fragments resulted in an impaired vascularization of implanted scaffolds and a delayed maturation process of individual blood vessels. Correspondingly, after the 14-days observation period, a lower number of vessels was detected within as well as in the surrounding tissue of scaffolds seeded with cryopreserved microvascular fragments. Therefore, it can be concluded that the additional cryopreservation has a severe impact on the vascularization capacity of microvascular fragments stimulated with IGF-1. A comparable vascularization of scaffolds, such as caused by IGF-1-stimulated non-cryopreserved microvascular fragments, cannot be achieved.

### 3. EINLEITUNG

Therapiekonzepte für die Rekonstruktion von Weichteildefekten und den Ersatz ganzer Organe nach Verletzung, Krankheit oder Degeneration beruhen heutzutage hauptsächlich auf autologen oder allogenen Transplantationen. Dem Verfahren der Transplantation sind aber Grenzen gesetzt. Die Limitation an verfügbaren Spenderorganen, Abstoßungsreaktionen und Komplikationen an Entnahme- und Empfängerstelle sowie die Risiken einer lebenslangen Immunsuppression sind wesentliche Aspekte, die für die Entwicklung neuer Methoden sprechen. Damit beschäftigt sich das vielversprechende Forschungsfeld des Tissue Engineerings, dessen primäres Ziel es ist, funktionsfähige Ersatzgewebe und -organe künstlich herzustellen.

#### 3.1 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering ist ein relativ junges Forschungsfeld, dessen Ursprünge in den späten 1970er-Jahren liegen [BERTHIAUME et al., 2011]. Der Begriff *Tissue Engineering* wurde 1993 erstmals definiert als interdisziplinärer Fachbereich, in welchem Natur-, Lebens- und Ingenieurwissenschaften zusammenarbeiten, um die native dreidimensionale Architektur eines Gewebes oder Organs nachzuempfinden und die adäquate Besiedlung mit Zellen sowie deren Funktionserhalt und Differenzierung sicherzustellen [LANGER et al., 1993]. Das grundlegende Prinzip des Tissue Engineerings umfasst mehrere Schritte: Die Isolation von Zellen aus Gewebebiopsien, deren Vermehrung mittels Zellkulturtechniken und ihre Ansiedlung auf Trägermatrizes, sogenannten Scaffolds.

Die ersten klinischen Anwendungen künstlich generierter Gewebe finden sich Anfang der 1980er Jahre. So wurden Biomaterialien mit kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten besiedelt, um einen funktionellen Hautersatz für Patienten mit großflächigen Brandwunden zu generieren [GALLICO et al., 1984; IKADA, 2006]. Wenig später folgten Ansätze zur gesteuerten Gewebe- und Knochenregeneration (Guided Tissue-/Bone Regeneration; GTR/GBR) bei parodontalen Substanzverlusten mit Hilfe

von Biomembranen [CERRAI et al., 1999] und die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) zur Rekonstruktion von Knorpeldefekten [BRITTBURG et al., 1994]. Schließlich gelang sogar der permanente Ersatz einer Urethra sowie einer Trachea durch zellbesiedelte biodegradierbare Scaffolds [EL-KASSABY et al., 2003; MACCHIARINI et al., 2008].

Beim Tissue Engineering bilden Scaffolds ein dreidimensionales Trägergerüst, an dem Zellen adhären und proliferieren können und welches in einen Gewebedefekt des Patienten implantiert wird [LASCHKE et al., 2006]. Im Wesentlichen können zwei Arten von Scaffolds unterschieden werden: Synthetisch hergestellte Matrices aus Polymeren sowie Scaffolds biologischen Ursprungs [HODDE, 2002; KIRILLOVA et al., 2021]. Dabei kann das Scaffold je nach Einsatz und Anforderung sowohl in dreidimensionaler poröser Form als auch als Hydrogel vorliegen [MANO et al., 2007]. Zu den am meisten angewandten synthetischen Scaffold-Materialien zählen Polyglykolsäure (PGA), Polylactid (PLA) oder Polyethylenglycol (PEG) [AGRAWAL et al., 2001]. Speziell für die Behandlung von Knochendefekten rücken zudem formstabile Materialien, wie Calciumphosphat-Zement, und auch bioaktive Gläser, wie 45S5 Bioglass®, zunehmend in den Fokus der Forschung [BAINO et al., 2018; TAN et al., 2021].

Trotz vieler Vorteile bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften sowie ihrer guten Biodegradierbarkeit ist der Einsatz von Scaffolds aus synthetischen Materialien nicht immer uneingeschränkt möglich. Einige Polymere können je nach Konzentration eine Immunantwort oder sogar toxische Reaktionen im Organismus hervorrufen [PINA et al., 2019]. Scaffolds natürlichen Ursprungs werden zum größten Teil aus Algen sowie pflanzlichen und tierischen Quellen extrahiert und bestehen aus Biopolymeren, zu denen beispielsweise Kollagen, Alginat, Chitin oder auch Cellulose gehören. Diese Biopolymer-basierten Scaffolds bieten den Vorteil einer hohen Biokompatibilität, guten Verfügbarkeit und vergleichsweise einfachen Verarbeitung. Zudem weisen sie eine starke Ähnlichkeit zur extrazellulären Matrix des Körpers auf, die ein optimales Umgebungsmilieu für die Ansiedlung von Zellen bietet. Ungünstig wirken sich dagegen ihre häufig rasche Biodegradierung, mechanische Instabilität und Anfälligkeit für Kontaminationen auf einen Einsatz *in vivo* aus [MANO et al., 2007; TARUN et al., 2011].

Hybride oder auch Komposite vereinen die Vorzüge mehrerer Biomaterialien durch Kombination zu einem neuen Werkstoff [SETAYESHMEHR et al., 2019]. Beispiel eines solchen Komposits ist das kommerziell erhältliche Integra<sup>®</sup>, eine Hautersatzmatrix, die aus vernetztem Rindersehnenkollagen und Glykosaminoglykan aus Haifischknorpel besteht. Klinisch werden synthetische Hautäquivalente seit Jahrzehnten bei der temporären Deckung vollschichtiger Hautdefekte und bei Schwerbrandverletzungen eingesetzt. Die Effizienz von Integra<sup>®</sup> konnte bereits vielfach in klinischen Studien belegt werden [DANTZER et al., 2001; MOIEMEN et al., 2006; HALMY et al., 2012]. Während des Wundheilungsprozesses induziert die Matrix eine Zellinvasion sowie Gefäßeinsprossungen und begünstigt auf diese Weise die Ausbildung einer Neodermis [BURKE et al., 1981]. Das Biomaterial selbst unterliegt schrittweise der Degradation und ist nach etwa 30 Tagen vollständig abgebaut [SHERIDAN et al., 1994]. Die transiente humorale Immunantwort auf die bovine Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrix nach Implantation fällt sehr gering aus bzw. ist bei Patienten zum Teil nicht nachzuweisen, sodass Integra<sup>®</sup> als immunologisch unbedenklich deklariert wird [MICHAELI et al., 1990]. Beim Tissue Engineering wird Integra<sup>®</sup> zudem häufig als Scaffold in tierexperimentellen Studien verwendet [FRUEH et al., 2017a; SPÄTER et al., 2018].

Ein wesentliches Problem in der Anwendung des Tissue Engineerings ist die Tatsache, dass Scaffolds nach ihrer Implantation *in vivo* nicht direkt vaskularisiert sind. Um das Überleben und den dauerhaften Funktionserhalt von Gewebekonstrukten zu gewährleisten, muss aber eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der darin befindlichen Zellen sichergestellt sein. Bis zu einem Abstand von 200 µm zwischen Zellen und Blutgefäß kann dieser Stofftransport per Diffusion erfolgen [JAIN et al., 2005]. Dies erklärt, weshalb dünne Gewebe mit geringen metabolischen Anforderungen, wie Haut und Knorpel, ohne Durchblutung klinisch bereits erfolgreich eingesetzt werden. Innerhalb größerer dreidimensionaler Implantate mit höheren metabolischen Anforderungen muss sich dagegen in kürzester Zeit ein perfundiertes vaskuläres Netzwerk entwickeln, um einen Zelltod zu verhindern und den dauerhaften Erhalt und die Integration der Gewebekonstrukte *in vivo* sicherzustellen [BAE et al., 2012].

In den vergangenen Jahren wurden aus diesem Grund diverse Strategien entwickelt, die die Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte beschleunigen sollen. Hauptsächlich können dabei zwei Ansätze unterschieden werden. Zum einen kann die Angiogenese im Empfängerorganismus stimuliert werden. Zum anderen werden Scaffolds prävasikularisiert, d.h., dass in ihnen noch vor Implantation ein mikrovaskuläres Gefäßsystem gezüchtet wird [LASCHKE & MENDER, 2012].

Zur Stimulation der Angiogenese kann bereits das eingesetzte Biomaterial entscheidend beitragen. RÜCKER et al. [2006] wiesen beispielsweise nach, dass das Einwachsen von Gefäßen in Scaffolds aus Polylactid-co-Glycolid (PLGA) wesentlich schneller erfolgt als in Hydrogel-Scaffolds identischer netzförmiger Architektur. Der Grund dafür liegt in der Entzündungsreaktion, die durch das jeweilige Material ausgelöst wurde. Die PLGA-Scaffolds induzierten nur eine leichte Entzündung, die stimulierend auf die Gefäßneubildung wirkte, während die Hydrogel-Scaffolds eine schwere Entzündung verursachten, die mit ausgeprägtem Zellverlust aufgrund von Apoptose einherging. Auch die Porosität von Scaffolds beeinflusst ihre Vaskularisierung und Integration in das Empfängergewebe. DRUECKE et al. [2004] variierten die Porengröße von Polyether/Polyester-Copolymer Scaffolds von 20 bis 300 µm. Große Porendurchmesser um 300 µm zeigten dabei die besten Resultate. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Vaskularisierung von Scaffolds ist das *Microchanneling*. Bei diesem Verfahren werden mittels 3D-Druck-Verfahren und bestimmten Lasersystemen Tunnel innerhalb von Hydrogel-Scaffolds generiert. Diese präformierten Tunnel fördern die Migration von Endothelzellen und dienen einwachsenden Blutgefäßen als Leitschiene für eine zielgerichtete Vaskularisierung [BERTASSONI et al., 2014; BURTON et al., 2018]. Auch der Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF) oder Angiogenin, bietet eine Möglichkeit, die lokale Gefäßneubildung zu stimulieren [KAIGLER et al., 2006; GUAN et al., 2007; SHI et al., 2008; LI et al., 2009]. Diese Faktoren werden, an Nanopartikel gebunden oder in Mikrosphären mit definierter Degradationsrate verkapselt, auf die Oberfläche von Scaffolds geladen, sodass sie kontinuierlich an das umliegende Gewebe abgegeben werden können [PERETS et al., 2003; LINDHORST et al., 2010; ANDERSON et al., 2011].

Die genannten Ansätze stimulieren zwar erfolgreich die Angiogenese, diese kann aber nicht unbegrenzt beschleunigt werden. Mehrere Studien belegen, dass die Obergrenze der physiologischen Wachstumsgeschwindigkeit von Blutgefäßen bei ca. 5 µm/h liegt [ZAREM, 1969; ORR et al., 2003]. Bei implantierten Gewebekonstrukten besteht somit das Problem, dass einwachsende Blutgefäße aus dem umliegenden Empfängerorgewebe die ersten Tage nach Implantation nicht in zentrale Areale der Scaffolds vordringen und damit deren Zentrum nicht ausreichend mit Blut versorgt ist. Somit können auch durch erfolgreiche pro-angiogene Strategien Nekrosen in zentralen Anteilen großer dreidimensionaler Gewebekonstrukte aufgrund von Hypoxie nicht verhindert werden [LASCHKE et al., 2016a].

Einen möglichen Lösungsansatz für dieses Problem bietet das Konzept der Prävascularisierung. Dieses Konzept basiert darauf, dass noch vor Implantation ein mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb von Scaffolds generiert wird. Nach Implantation müssen sich lediglich Verbindungen zwischen den präformierten Blutgefäßen innerhalb der Scaffolds und den einwachsenden Blutgefäßen des Empfängerorganismus ausbilden. Dieser Prozess wird auch als Inoskulation bezeichnet [LASCHKE et al., 2009]. Letztlich wird so eine vollständige Perfusion der Scaffolds erreicht und die Zeitspanne nach Implantation, in der die Gewebekonstrukte avaskulär sind und Zellen unter Hypoxie Schaden nehmen können, deutlich verkürzt [LASCHKE et al., 2016a].

Bisher wurden eine Reihe unterschiedlicher *in vitro* und *in vivo* Strategien erprobt, um präformierte Blutgefäßsysteme innerhalb von Gewebekonstrukten herzustellen. Eine Möglichkeit der *in vitro* Prävascularisierung ist die Ko-Besiedlung von Scaffolds in Kultur mit Einzelzellen, wie endothelialen Vorläuferzellen und pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. Diese Zellen differenzieren sich zu Endothelzellen und bilden kapilläre Strukturen aus [DUTTENHOEFER et al., 2013; LIU et al., 2013]. Alternativ können *in vivo* Strategien zur Prävascularisierung angewandt werden. Hierbei wird der lebende Organismus als natürlicher Bioreaktor zur Gefäßneubildung genutzt. Ein Scaffold wird in ein gut durchblutetes Gewebe implantiert, was zum Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umliegenden Empfängerorganismus in das Gewebekonstrukt führt. Nachdem sich auf diese Weise ein gut perfundiertes Gefäßnetzwerk innerhalb des Implantats gebildet hat, erfolgt in

einem zweiten operativen Verfahren der Transfer des prävaskularisierten Konstrukts in den eigentlichen Gewebedefekt. Eine Variante stellt die Lappentechnik dar. Bei dieser Methode wird ein Scaffold primär in einen Muskellappen implantiert. Nach der vollständigen Vaskularisierung des Scaffolds erfolgt sekundär der freie Transfer des gesamten Muskellappens einschließlich des inkorporierten, prävaskularisierten Scaffolds an die Defektstelle. Der Gefäßstiel des Muskellappens wird lokal mit Gefäßen des Empfängers anastomosiert, was zu einer sofortigen Reperfusion des Implantates führt [KOKEMUELLER et al., 2010]. Zusätzlich kann die Prävaskularisierung von Scaffolds im Gewebe durch Anlegen einer arteriovenösen Schleife (*AV-loop Technik*) gezielt gesteigert werden. In der Nähe des Scaffolds werden dabei eine Arterie und eine Vene anastomosiert. Durch die so induzierten Scherkräfte im Bereich dieser arteriovenösen Schleife wachsen vermehrt Gefäße in die Umgebung aus und vaskularisieren dadurch auch verstärkt das Scaffold [EROL et al., 1980; SCHMIDT et al., 2015].

Die bisher beschriebenen Prävaskularisierungsstrategien schließen teilweise zeitintensive Zellkulturtechniken, mehrschrittige operative Eingriffe und Defekte an intaktem Muskel- oder Weichteilgewebe ein. Eine wichtige Voraussetzung für einen breiten klinischen Einsatz von Tissue Engineering-Verfahren ist aber eine praktikable und funktionale Umsetzung. Eine aussichtsreiche Strategie, die seit mehreren Jahren intensiv verfolgt wird, ist der Einsatz mikrovaskulärer Gefäßfragmente als Vaskularisierungseinheiten.

### **3.2 Mikrovaskuläre Fragmente als Vaskularisierungseinheiten**

Isolierte mikrovaskuläre Fragmente (*Abbildung 1*) sind natürliche Vaskularisierungseinheiten, die aufgrund ihrer hohen angiogenen Aktivität vielfältige Einsatzmöglichkeiten für das Tissue Engineering bieten. Sie bestehen aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einer typischen Gefäßmorphologie [HOYING et al., 1996]. In vielerlei Hinsicht erfüllen sie die Ansprüche an einen klinischen Einsatz. So werden

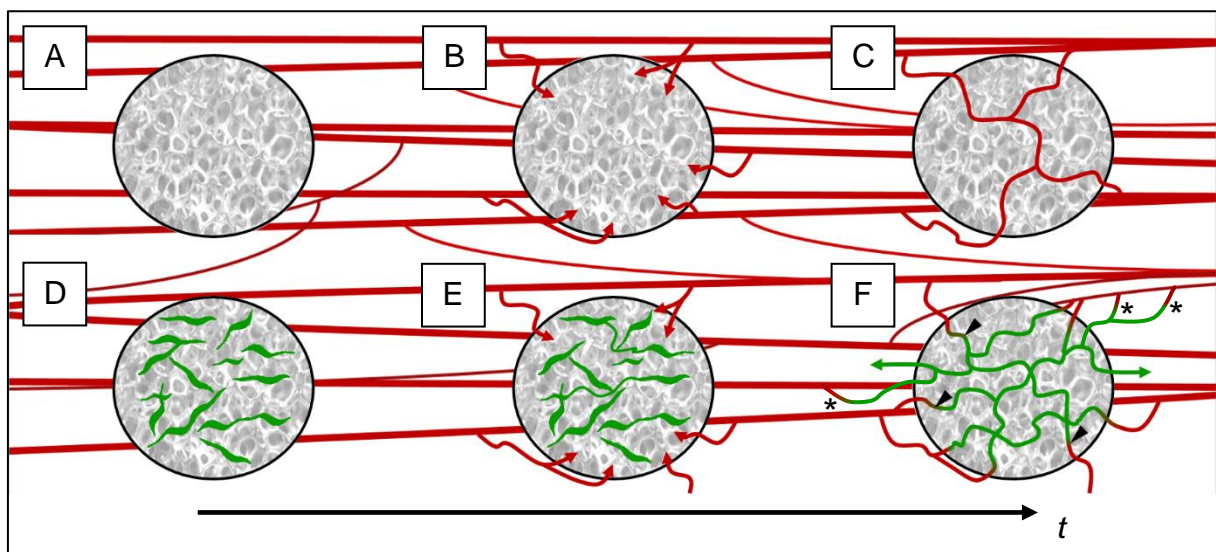




**Abbildung 1:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines mikrovaskulären Fragments (Pfeil) nach enzymatischer Isolierung aus murinem Fettgewebe. Maßstab: 80  $\mu\text{m}$ .

sie enzymatisch aus Fettgewebe isoliert, welches gezielt mittels Liposuktion oder aber als Nebenprodukt bei diversen operativen Verfahren gewonnen werden kann. Zudem enthalten sie mesenchymale Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen, Lymphgefäßfragmente und Immunzellen, was zu dem hohen regenerativen Potential der mikrovaskulären Fragmente beiträgt [MCDANIEL et al., 2014; LASCHKE et al., 2021]. Entsprechend rasch bilden sie *in*

*vivo* über Aussprossungsprozesse und Inoskulation untereinander sowie mit den Gefäßen des Empfängerorganismus dicht vernetzte, perfundierte Gefäßsysteme aus [SHEPHERD et al., 2004] (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Vaskularisierung eines implantierten Scaffolds ohne (A – C) und mit (D – F) Besiedlung mit mikrovaskulären Fragmenten im Zeitverlauf. **A – C:** Im Rahmen der Angiogenese wachsen Kapillaraussprossungen (rote Pfeile) aus dem Empfängerorgewebe (rot) in das Scaffold ein und verbinden sich zu einem perfundierten Gefäßsystem. **D:** Das Scaffold wurde mit mikrovaskulären Fragmenten (grün) besiedelt und in vaskularisiertes Empfängerorgewebe (rot) implantiert. **E:** Gefäße des Empfängerorgewebes wachsen ein (rote Pfeile). Innerhalb des Scaffolds bilden die mikrovaskulären Fragmente ein präformiertes Netzwerk (grün). **F:** Gefäße des präformierten Netzwerkes (grün) wachsen aus dem Scaffold in das umliegende Gewebe ein (grüne Pfeile). Die mikrovaskulären Fragmente verbinden sich sowohl innerhalb (interne Inoskulation; schwarze Pfeilspitzen) als auch außerhalb des Scaffolds (externe Inoskulation; Sterne) mit Gefäßen des Empfängerorgewebes.

Die weitreichenden Einsatzmöglichkeiten mikrovaskulärer Fragmente als Vaskularisierungseinheiten wurden bereits in verschiedenen Studien belegt. PILIA et al. [2014] generierten im Rahmen einer tierexperimentellen Studie prävaskularisierte Gewebekonstrukte zur Defektdeckung bei volumetrischem Muskelverlust. Nach partieller Exzision des Musculus tibialis anterior erfolgte die Implantation dreidimensionaler Kollagenmatrizes in das Wundbett. Matrizes, welche zuvor mit mikrovaskulären Fragmenten beladen worden waren, zeigten innerhalb des Versuchszeitraums eine signifikant verbesserte Vaskularisierung im Vergleich zu Scaffolds, welche unbeladen oder mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt waren. FRUEH et al. [2017a] besiedelten Kollagen-Glycosaminoglykan-Matrizes mit mikrovaskulären Fragmenten und implantierten diese in Vollhautdefekte von Mäusen. Dies führte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbeladenen Matrizes zu einer schnelleren Vaskularisierung und Integration der Implantate in das umliegende Empfängergewebe. Des Weiteren konnte der stimulierende Effekt von mikrovaskulären Fragmenten auf die Vaskularisierung auch bei Lappenplastiken [NAKANO et al., 1998], myokardialen Defekten [NAKANO et al., 1999], Knochenersatzverfahren [ORTH et al., 2018] sowie transplantierten Langerhans-Inseln innerhalb von Kollagenmatrizes [HISCOX et al., 2008] nachgewiesen werden.

LASCHKE et al. [2012] beschrieben erstmals die erfolgreiche Besiedlung poröser Polyurethan-Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten. Über einen 2-wöchigen Untersuchungszeitraum konnte in den prävaskularisierten Scaffolds im Vergleich zu einer unbesiedelten Kontrollgruppe eine erheblich schnellere Vaskularisierung erzielt werden. Die Gefäßfragmente proliferierten dabei nicht nur innerhalb der Scaffolds, sondern wuchsen auch in das umliegende Empfängergewebe ein (*Abbildung 2*).

### **3.3 Metabolische Aktivierung mikrovaskulärer Fragmente**

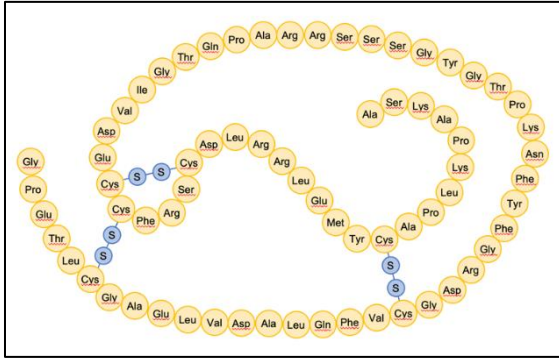
Der Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten im Tissue Engineering ist ein vielversprechender Ansatz zur Beschleunigung der Vaskularisierung von Gewebekonstrukten. Dennoch kann in den ersten 3 bis 6 Tagen nach Implantation nicht mit einer Reperfusion präformierter Blutgefäße innerhalb von Gewebekonstrukten gerechnet werden, sodass ein Zelluntergang nicht zu vermeiden ist [LASCHKE et al.,

2008]. Um die Reifung präformierter Blutgefäße *in vivo* zu beschleunigen und eine raschere Inoskulation mit dem Gefäßsystem des Empfängers zu erreichen, ist es möglich, mikrovaskuläre Fragmente vor der Implantation für 24 Stunden zu kultivieren. Die Kultivierung von reifen Gefäßen führt zu einer Destabilisierung der einzelnen Blutgefäße mit dem Verlust von perivaskulären glatten Muskelzellen. Durch diese Destabilisierung wird die Migration von Endothelzellen erleichtert und die Gefäßentwicklung sowie der Prozess der Verbindung zwischen den präformierten Gefäßen und dem Gefäßsystem des Empfängers beschleunigt [SHEPHERD et al., 2004; LASCHKE et al., 2011a]. Die Kultivierung hat nachweislich keinen negativen Einfluss auf die Gefäßmorphologie, sondern bietet vielmehr die Möglichkeit einer pro-angiogenen Stimulierung der Gefäßfragmente durch Zugabe von Wachstumsfaktoren [KARSCHNIA et al., 2018]. Unter Verwendung von University-of-Wisconsin (UW)-Lösung statt konventioneller Zellkulturmedien kann die Kultivierung zudem xeno-frei, d.h. unter Vermeidung nichthumaner Proteine und konform zu den Richtlinien für Gute Herstellungspraxis (GMP), durchgeführt werden [LASCHKE et al., 2019b]. Dies ist hinsichtlich einer künftigen klinischen Umsetzung von zentraler Bedeutung.

Mikrovaskuläre Fragmente werden mittels enzymatischer Digestion aus Fettgewebe isoliert. Dabei unterscheidet sich das Gefäßsystem im Fettgewebe hinsichtlich seiner metabolischen Stimulierbarkeit von anderen Gewebearten. HALBERG et al. [2009] berichteten, dass hypoxischer Stress über eine vermehrte Expression des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)-1 $\alpha$  nicht, wie anzunehmen, eine Kaskade pro-angiogener Prozesse anstößt, sondern im Fettgewebe vorwiegend zu Fibrose führt. Im Gegensatz dazu aktivieren insbesondere metabolische Signale, beispielsweise in Folge einer hochkalorischen Ernährung, die lokale Gefäßproliferation [CAO, 2013]. Die Ursache dieses Sachverhalts liegt sehr wahrscheinlich in der engen Korrelation zwischen Adipogenese und Angiogenese. So sezerniert das Fettgewebe in seiner Funktion als endokrines Organ eine Vielzahl von Adipokinen, die sowohl einen stimulierenden als auch einen inhibierenden Einfluss auf die Gefäßneubildung haben können. Das von Adipozyten gebildete Proteohormon Leptin wirkt nachweislich pro-angiogen, während Adiponectin eine anti-angiogene Wirkung aufweist [PARK et al., 2001; PALANISAMY et al., 2019].

Im Gegensatz zur Mikrozirkulation anderer Gewebearten enthalten Gefäßwände innerhalb von Fettgewebe adipozytäre Vorläuferzellen. Diese Präadipozyten können bei Bedarf zu Adipozyten heranreifen und tragen entscheidend zum Fettgewebswachstum bei [TANG et al., 2008]. Im Fettgewebe wiederum sind multipotente Zellen lokalisiert, welche zu Endothelzellen differenzieren können und die Angiogenese unterstützen [JUMABAY et al., 2012]. Bereits in der Embryonalzeit wird die Relevanz und Komplexität der Verknüpfung von Angiogenese und Adipogenese deutlich. Während der Entwicklung primitiver Fettorgane formiert sich ein Gefäßbett noch vor der Migration und Differenzierung von Adipozyten. Das Gefäßsystem dient dem Fettgewebe demzufolge als eine Art Leitschiene [CRANDALL et al., 1997]. Zudem belegten LEMOINE et al. [2013], dass auch das postnatale Fettgewebswachstum maßgeblich von dessen Blutgefäßsystem und seiner proliferativen Aktivität gesteuert wird. Dementsprechend geht die Expansion von Fettgewebe mit einer starken Angiogenese einher, während der Abbau von Fettzellen mit einer Gefäßregression assoziiert ist. Eine gezielte Suppression der Vaskularisierung des Fettgewebes, wie sie BRÅKENHIELM et al. [2004] in experimentellen Studien mithilfe des Angiogenesehemmers TNP-470 durchführten, verhindert sogar die ernährungsbedingte Fettzunahme. GEALEKMAN et al. [2014] wiesen in diesem Zusammenhang auf zellulärer Ebene nach, dass Insulin über eine vermehrte Ausschüttung des Wachstumshormons insulin-like growth factor (IGF)-1 (*Abbildung 3*) und dessen Bindung an den IGF-1-Rezeptor von Zellen der stromalen vaskulären Fraktion (SVF) die Angiogenese im Fettgewebe stimuliert. Dieser Wirkmechanismus kann durch das insulin-like growth factor binding protein (IGFbp)4 wiederum vollständig inhibiert werden (*Abbildung 4*).

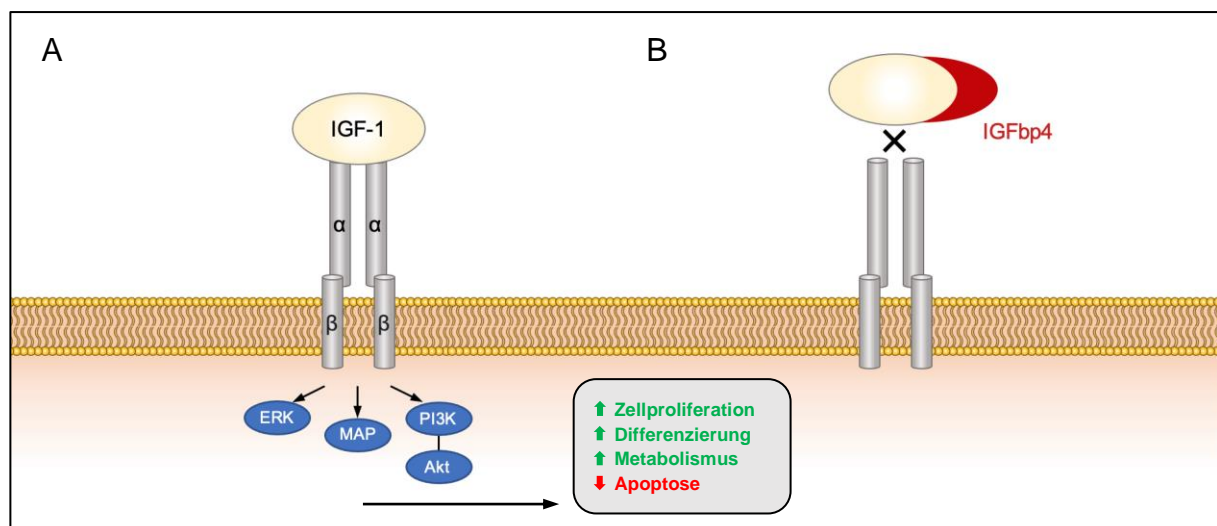
IGF-1 ist sowohl für die Adipozytendifferenzierung als auch für die Angiogenese ein essentieller Regulator [GREGOIRE et al., 1998; DOBRUCKI et al., 2010]. Das Wachstumshormon setzt sich aus 70 Aminosäuren zusammen, die sich in einer einzelnen Peptidkette aneinanderreihen und deren Tertiärstruktur durch drei intramolekulare Disulfidbrücken gebildet wird [RINDERKNECHT et al., 1978] (*Abbildung 3*). Endogen wird IGF-1 hauptsächlich von der Leber produziert.



**Abbildung 3:** Aminosäuresequenz des Wachstumshormons IGF-1. Aufbau aus 70 Aminosäuren (ein Kreis präsentiert je eine Aminosäure), die in einer einzigen Peptidkette aneinandergereiht vorliegen. Intramolekular finden sich drei Disulfidketten (blau), wodurch jeweils zwei Cystein-Moleküle kovalent miteinander verbunden werden.

Hauptstimulus der IGF-1-Synthese und -Sekretion ist dabei das in der Adenohypophyse gebildete Peptidhormon Somatotropin (GH) [SJÖGREN et al., 1999]. Daneben wird IGF-1 von diversen anderen Gewebearten sezerniert. Innerhalb des Fettgewebes sind insbesondere Adipozyten und Makrophagen für die autokrine sowie parakrine Sekretion von IGF-1 verantwortlich [CHANG et al., 2016]. Der Serumspiegel von IGF-1 ist stark alters- sowie geschlechtsabhängig und sinkt nach maximalen Werten während der

Adoleszenz von über 500 ng/ml im Alter graduell ab [BIDLINGMAIER et al., 2014]. Klinisch wird rekombinantes humanes IGF-1 (rhIGF-1) im Fall eines primären IGF-1-Mangels bei Kindern angewandt. Die Substitution des Peptidhormons (Increlex® Mecasermin) ist derzeit die einzige Therapiemöglichkeit, um einem Kleinwuchs entgegenzuwirken [RANKE, 2015]. Missbräuchlich findet IGF-1 aufgrund seines anabolen Potentials Verwendung als Dopingsubstanz bei Sportlern [HOLT et al., 2008].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des IGF-1-Rezeptors. **A:** Der IGF-1-Rezeptor ist ein transmembranäres Heterotetramer (2α; 2β). Die extrazellulären α-Untereinheiten sind dabei verantwortlich für die Ligandenbindung, während die β-Domänen die rezeptortypische Enzymgruppe, die Tyrosinkinase, tragen. Über diese wird die IGF-1-abhängige Induktion mitogener und anti-apoptotischer Signalkaskaden in der Zielzelle vermittelt. **B:** Die Bindung von IGFbp4 an IGF-1 verhindert eine Interaktion des Wachstumshormons mit dem Rezeptor und inhibiert somit rezeptorvermittelte Signalkaskaden.

IGF-1 wirkt als Wachstumshormon überwiegend zelldifferenzierend, proliferativ und anti-apoptotisch [LAVIOLA et al., 2007]. Darüber hinaus fördert es ähnlich wie Insulin die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen [SIMPSON et al., 2004]. Vermittelt werden diese Mechanismen über verschiedene rezeptorinduzierte Signalkaskaden, insbesondere dem Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- und dem Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg [GRIFFETH et al., 2014; TANIGUCHI et al., 2006] (*Abbildung 4A*). Diese lösen eine Phosphorylierungskaskade intrazellulärer Moleküle aus, welche letztlich Einfluss auf Apoptose, Genexpression, Glukosetransport sowie Mitose nehmen [FOULSTONE et al., 2005; GRIFFETH et al., 2014]. SHIGEMATSU et al. [1999] untersuchten den Einfluss von IGF-1 auf verschiedene Phasen der Angiogenese. Dabei konnte gezeigt werden, dass IGF-1 die Bildung neuer Blutgefäße stimuliert. Endothelzellen werden durch das Wachstumshormon zur Migration angeregt und lagern sich in IGF-1-supplementiertem Medium vermehrt zu gefäßähnlichen Strukturen zusammen. Zudem stabilisiert IGF-1 durch eine verlängerte Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK) und Antagonisierung der Lysophosphatidsäuren (LPA)-induzierten Gefäßregression neuformierte Blutgefäße [JACOBO et al., 2015]. Das Wachstumshormon vermittelt seine Wirkung über den IGF-1-Rezeptor (*Abbildung 4A*). Dieser ist im Körper nahezu ubiquitär vorzufinden und weist eine hohe Sequenzhomologie zum Insulin-Rezeptor auf [CLEMMONS, 2012]. Im Fettgewebe wird der IGF-1-Rezeptor auf Endothelzellen [CHISALITA et al., 2004], Perizyten [KOSTALLARI et al., 2015], glatten Gefäßmuskelzellen [HSIEH et al., 2003], Fibroblasten [DUPONT et al., 2001], mesenchymalen Stammzellen [SCAVO et al., 2004], diversen Immunzellen [HIGASHI et al., 2016; STUART et al., 1991] und Präadipozyten [BOUCHER et al., 2010] exprimiert. Auf reifen Adipozyten ist der IGF-1-Rezeptor dagegen nicht nachzuweisen [CLEMMONS, 2012; GEALEKMAN et al., 2014]. IGF-1 zeigt eine hohe proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf Zellen. Diese Eigenschaften können das Wachstum von Neoplasien begünstigen. Aus diesem Grund wird der IGF-1-Signalweg bereits seit Jahrzehnten in der Tumorforschung untersucht. Eine gezielte Blockade der IGF-1-Wirkung stellt eine vielversprechende Therapieoption von malignen Erkrankungen dar [WEROHA et al., 2012; MENDES et al., 2020].

Die pro-angiogenen Eigenschaften von IGF-1 konnten bereits in mehreren Studien *in vitro* [NICOSIA et al., 1994; LIU et al., 2001; LIN et al., 2017] sowie *in vivo* [RABINOVSKY et al., 2004] belegt werden. KONDO et al. [2003] untersuchten die Wirkung von IGF-1 in einem Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie. Knockout-Mäuse mit einer selektiven Defizienz des IGF-1-Rezeptors auf Endothelzellen zeigten hierbei eine verminderte retinale Neovaskularisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. SMITH et al. [1999] konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass hohe IGF-1-Level vermutlich mittels Aktivierung von VEGF und MAPK die retinale Neovaskularisierung fördern. Weiter zeigten SU et al. [2003] mit Hilfe eines Matrigel®-Plug Angiogenese-Assays, dass eine Gentransfervektor-vermittelte Expression von IGF-1 die Angiogenese *in vivo* verbessert und Kardiomyozyten vor einem Ischämie-bedingten apoptotischen Zelltod schützt. Weitere Studien belegten den pro-angiogenen Einfluss von IGF-1 während der embryonalen Phase der Lungenentwicklung [HAN et al., 2003] sowie während des vaskulären Remodelings im adulten Gehirn nach Schädel-Hirn-Traumen [LOPEZ-LOPEZ et al., 2004]. Basierend auf diesen Beobachtungen stellt IGF-1 einen erfolgversprechenden Stimulus für die pro-angiogene Aktivierung isolierter Gefäßfragmente dar. Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Hypothese geprüft, **dass eine metabolische Stimulierung mit IGF-1 die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Fragmente verbessert. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Effekte von IGF-1 durch IGFBP4 inhibiert werden können.**

### 3.4 Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

Im Zuge des demographischen Wandels ist anzunehmen, dass der Anteil der älteren Bevölkerung aufgrund eines nachhaltigen Anstiegs der Lebenserwartung und eines niedrigen Geburtenniveaus in den kommenden Jahrzehnten eine stetige Zunahme erfahren wird. In Konsequenz bedeutet dies für das Gesundheitssystem die Versorgung eines vorwiegend älteren Patientenklintels [PALACIOS, 2002]. Dabei ist es fraglich, ob ein suffizienter Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten für das Tissue Engineering in älteren Patienten generell möglich ist. Wie eine experimentelle Studie bereits zeigen konnte, weisen Gefäßfragmente aus dem Fettgewebe gealterter Spendertiere im Vergleich zu Fragmenten aus adulten Tieren eine signifikant

reduzierte Vaskularisierungskapazität auf [LASCHKE et al., 2014]. Eine Methode, die vorteilhaften Eigenschaften von mikrovaskulären Fragmenten aus einem juvenilen bzw. adulten Organismus zu erhalten und sie gegebenenfalls zu einem späteren Lebenszeitpunkt einzusetzen, ist die Kryokonservierung [LASCHKE et al., 2018].

Die Kryokonservierung beschreibt einen Prozess, bei welchem strukturell intakte, lebende Zellen und Gewebe unter sehr niedrigen Temperaturen für lange Zeit präserviert werden können [PEGG, 2007]. Während eines ungeschützten Kühlvorgangs von biologischem Material entstehen intra- sowie extrazellulär Eiskristalle, welche die Zellmembran und -organellen mechanisch schädigen können. Die Eiskristallbildung bedingt zudem eine Dehydrierung der Zellen und Konzentrationserhöhungen gelöster Stoffe, welche toxische Werte erreichen können [MAZUR, 1963; KARLSSON & TONER, 1996]. Um diese irreversiblen Gefrierschäden zu verhindern und die Viabilität sowie Funktionalität der Zellen zu bewahren, müssen mehrere Faktoren beachtet werden. Zum einen liegt der Fokus auf einer angemessenen Kühl- und Auftauungsrate, die einen kontrollierten Wasserein- und -ausstrom über die Zellmembranen erlaubt [JANG et al., 2017]. Zum anderen kann durch den Zusatz von Kryoprotektiva die Entstehung von Eiskristallen verhindert werden [LOVELOCK et al., 1959]. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte bietet die Kryokonservierung viele klinische Anwendungsmöglichkeiten, die in verschiedenen Fachbereichen bereits genutzt werden. So spielt die Kryokonservierung beispielsweise eine große Rolle in der Reproduktionsmedizin. Spermatozoen [SZELL et al., 2013], Oozyten [BORINI et al., 2010] und Embryonen [WONG et al., 2014] können kryokonserviert und im späteren Verlauf zwecks künstlicher Befruchtung eingesetzt werden. Darüber hinaus zählt die Retransplantation von ovariellm Gewebe nach onkologischer Vollremission mittels ovarian tissue banking zu den modernsten Techniken der Fertilitätserhaltung bei malignen Erkrankungen [DEMEESTERE et al., 2015]. Die Kryokonservierung von testikulärem Gewebe pädiatrischer onkologischer Patienten befindet sich zum aktuellen Forschungsstand in der präklinischen Studienphase [GOOSSENS et al., 2013].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre auch ein Biobanking von mikrovaskulären Fragmenten junger Spender denkbar. Bei einem Gewebedefekt im fortgeschrittenen Alter wäre es folglich möglich, die Gefäßfragmente aufzutauen, auf



ein Scaffold zu siedeln und dieses in einen Gewebedefekt zu implantieren. Ein vergleichbares Konzept wurde von CHOUDHERY und HARRIS [2014] in Bezug auf Stammzellen beschrieben. LASCHKE et al. [2018] konnten zudem in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass sich die Kryokonservierung als Verfahren zur Langzeitlagerung von mikrovaskulären Fragmenten eignet. Nach der Kryokonservierung war jedoch die Anzahl an verfügbaren Gefäßfragmenten reduziert und der Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente signifikant erhöht. Dies entspricht den Forschungsergebnissen verschiedener Studien, die einen Verlust von mindesten 10 – 20 % biologischen Materials bei einer Kryokonservierung berichten [VON BOMHARD et al., 2016; WHALEY et al., 2021]. In erster Linie ist dies nicht auf eine Zerstörung während des Kühlprozesses zurückzuführen, sondern auf das anschließende Waschen der Gefäßfragmente. Dabei werden die mikrovaskulären Fragmente mehrfach zentrifugiert, was zu einer Reduktion an biologischem Material führt [LAROCHE et al., 2005]. Dieser Schritt ist aber essentiell, um die mikrovaskulären Fragmente nach der Auftauphase von Kryoprotektivum zu befreien, da sich dessen zytotoxische Eigenschaften mit steigenden Temperaturen potenzieren [BEST, 2015]. Der Verlust an verfügbaren mikrovaskulären Fragmenten konnte durch eine erhöhte angiogene Aktivität der verbliebenen Gefäßfragmente *in vivo* kompensiert werden [LASCHKE et al., 2018]. Vor dem Hintergrund des ersten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit wäre es denkbar, mikrovaskuläre Fragmente nach ihrer Isolation aus dem Fettgewebe junger Spender mit IGF-1 zu stimulieren und anschließend zu kryokonservieren. Sollte der Einsatz von mikrovaskulären Fragmenten in einem späteren Lebensabschnitt nötig werden, könnten die Gefäßfragmente aufgetaut und zeitnah implantiert werden. Das hohe Vaskularisierungspotential von IGF-1-präkultivierten Fragmenten junger Spender könnte somit auch im Alter genutzt werden und würde zur Verbesserung von Fragment-basierten Vaskularisierungsstrategien für das Tissue Engineering beitragen. Aus diesem Grund sollte im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft werden, **dass das hohe Vaskularisierungspotential von IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten durch eine Kryokonservierung erhalten werden kann.**

Um die Hypothesen der vorliegenden Arbeit zu prüfen, wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem epididymalen Fettgewebe von Mäusen isoliert und in UW-Lösung

für 24 h bei 4 °C kultiviert. **Im ersten Studienabschnitt** war dem Kultivierungsmedium entweder Vehikel (Kontrolle), IGF-1 oder IGF-1 + IGFbp4 zugesetzt. Im Anschluss wurden die Fragmente verschiedenen *in vitro* Analysen unterzogen, die Aufschluss über ihre zelluläre Zusammensetzung, Expression von Wachstumsfaktoren, Zellviabilität und Proliferation geben sollten. Zudem wurden mikrovaskuläre Fragmente im Anschluss an die Kultivierungsphase auf Integra®-Matrizes gesiedelt und in Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen implantiert. Über einen 14-tägigen Zeitraum erfolgten repetitiv intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, anhand derer die fortschreitende Vaskularisierung der Implantate *in vivo* verfolgt werden konnte. Nach Abschluss des Versuchszeitraums ermöglichten zusätzliche histologische und immunhistochemische Färbungen eine genauere Beurteilung der Gefäßarchitektur innerhalb der Implantate. **Im zweiten Studienabschnitt** erfolgte der Vergleich von IGF-1-behandelten und zusätzlich kryokonservierten mikrovaskulären Fragmenten mit IGF-1-kultivierten Gefäßfragmenten ohne anschließende Kryokonservierung (Kontrolle). Analog zum ersten Studienabschnitt wurden *in vivo* Untersuchungen sowie histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt.

## 4. ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, das Vaskularisierungspotential von mikrovaskulären Fragmenten für das Tissue Engineering zu steigern. **Im ersten Studienabschnitt** wurde geprüft, ob durch eine Kultivierung mit IGF-1 eine Beschleunigung und Verbesserung der Vaskularisierung und Inkorporation von prävaskularisierten Scaffolds erreicht werden kann. Folgende Fragestellungen wurden dabei näher analysiert:

1. Hat eine IGF-1-Stimulation einen Effekt auf die zelluläre Zusammensetzung mikrovaskulärer Fragmente?
2. Führt eine IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente zu einer höheren Ausschüttung von pro-angiogenen Faktoren und einer verbesserten Viabilität und Proliferation?
3. Führt eine IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente zu einem verbesserten Vaskularisierungspotential *in vivo*?

Im zweiten Studienabschnitt wurde untersucht, in welchem Maß eine Kryokonservierung Auswirkungen auf das Vaskularisierungspotential von IGF-1-präkultivierten mikrovaskulären Fragmenten hat. Dabei wurde folgende Fragestellung näher analysiert:

Weisen IGF-1-stimulierte, kryokonservierte mikrovaskuläre Fragmente eine vergleichbare Vaskularisierung auf wie IGF-1-stimulierte Gefäßfragmente, welche nicht kryokonserviert wurden?

## 5. MATERIAL UND METHODIK

### 5.1 Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen aus hausinterner Zucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt. Als Spendertiere epididymalen Fettgewebes für die Isolierung mikrovaskulärer Fragmente dienten männliche green fluorescent protein (GFP)<sup>-</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Alter: 6 – 12 Monate; Körpergewicht: > 30 g) und transgene GFP<sup>+</sup> C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Mäuse (Alter: 6 – 12 Monate; Körpergewicht: > 30 g). Bei den Empfängertieren handelte es sich um C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Alter: 5 – 7 Monate; Körpergewicht: 24 – 26 g). Bei ihnen wurde eine Rückenhautkammer implantiert. Während des Versuchszeitraums wurden die Tiere am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in klimatisierter Umgebung (Temperatur: 22 °C) der hausinternen Tierhaltung bei einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere mit Rückenhautkammern wurden in Einzelkäfigen untergebracht. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

Die mikrovaskulären Fragmente für Untersuchungen *in vivo* wurden aus dem Nebenhodenfettgewebe von transgenen Mäusen des Stammes C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J isoliert. Das Besondere dieser gentechnisch veränderten Tiere ist die Transfektion mit einer cDNA, welche für das enhanced green fluorescent protein (EGFP) codiert. Erstmals beschrieben wurde GFP von SHIMOMURA im Jahr 1962 und entstammt der Quallenart *Aequorea victoria*. 1997 gelang es, eine transgene Mauslinie zu züchten, in der GFP fast ubiquitär exprimiert wird. Die cDNA unterliegt dabei der Kontrolle eines Huhn- $\beta$ -Aktin-Promotors und eines Cytomegalie-Enhancers. Jegliches Gewebe mit Ausnahme von Erythrozyten und Haaren fluoresziert unter blauem Anregungslicht grün. Das Optimum liegt hier bei einer Wellenlänge von 488 nm [OKABE et al., 1997]. Durch diese Markierungsmethode oder die Anwendung einer immunhistochemischen Färbung ist es möglich, die zuvor in das Implantat eingebrachten GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente eines transgenen Tieres im fortlaufenden

Vaskularisierungsprozess von den einwachsenden GFP<sup>+</sup> Gefäßen des Empfängergewebes differenzieren zu können und letztlich einen Rückschluss auf die Vitalität, die Verteilung sowie das Verhalten der mikrovaskulären Fragmente ziehen zu können.

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz (Abteilung C „Amtstierärztlicher Dienst, Lebensmittelüberwachung“, Saarbrücken, Genehmigungsnummer: 29/2014) bewilligt und konform der nationalen sowie europäischen Tierschutzrichtlinien (Direktive 2010/63/EU) und den NIH Leitlinien zum Schutz und zur Verwendung von Labortieren durchgeführt.

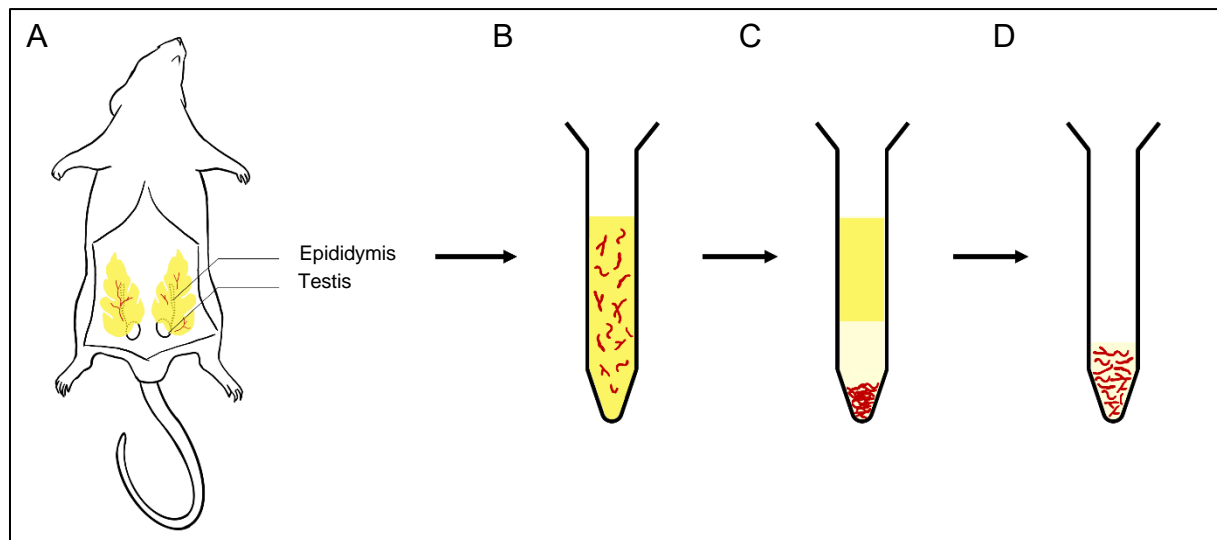
## 5.2 Mikrovaskuläre Fragmente

### 5.2.1 Isolierung

Die mikrovaskulären Fragmente wurden nach standardisiertem Protokoll aus murinem Nebenhodenfettgewebe gewonnen [FRUEH et al., 2017b] (*Abbildung 5*). Zu diesem Zweck wurden die Spendertiere mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht (KG); Ursotamin®, Serumwerke Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG; Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Es folgte eine gründliche Haarentfernung im Bauchbereich mithilfe eines Elektrorasierers (Elektra II GH 204, Ausculap, Tuttlingen, Deutschland) sowie eine Reinigung der Haut mit warmem Wasser und Desinfektionslösung (Softasept N, Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend erfolgte Tötung der Spendermäuse durch zervikale Dislokation.

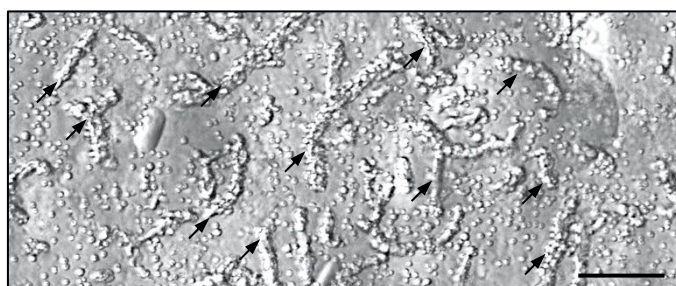
Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Leica M651, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, die bilateralen epididymalen Fettpolster freigelegt (*Abbildung 5A*) und anschließend sorgfältig exzidiert. Das Nebenhodenfettgewebe wurde in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline (PBS); Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen und bis zur weiteren Prozessierung in ein Nährmedium überführt (10 % Dulbecco's

Modified Eagle's Medium (DMEM), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; Biochrom, Berlin, Deutschland).



**Abbildung 5:** Isolierung von mikrovaskulären Fragmenten aus murinem epididymalem Fettgewebe. **A:** Lage des epididymalen Fettgewebes in situ nach Eröffnung des Abdomens. Die Nebenhoden (Epididymides) und Teile der Hoden (Testes) sind von Fettgewebe umgeben und ohne Präparation nicht sichtbar. **B:** Gefäßfragmentsuspension nach mechanischer Zerkleinerung und enzymatischer Digestion des Fettgewebes. **C:** Sedimentation der isolierten Gefäßfragmente nach Abschluss des enzymatischen Digestionsprozesses und Inkubation. Der Fettüberstand wird abpipettiert. **D:** Mikrovaskuläre Fragmente nach Zentrifugation und Resuspension in PBS + FKS.

Zur Isolierung von Gefäßfragmenten wurde das gewonnene epididymale Fett dreimalig in PBS gewaschen, in ein Reagenzglas überführt und für 3 Minuten mithilfe einer Mikroschere mechanisch zerkleinert. Um eine Isolierung der Gefäße durch Zerstörung der Adipozyten zu erreichen, wurde zu dem Gewebe eine Kollagenase-Lösung (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) gegeben und im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für 10 Minuten unter stetigem Rühren mittels Magnetrührer enzymatisch



**Abbildung 6:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme mikrovaskulärer Gefäßfragmente (Pfeile) direkt im Anschluss an den enzymatischen Isolierungsprozess aus dem Nebenhodenfettgewebe von GFP<sup>+</sup> C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Spendermäusen. Maßstab: 100 µm.

digestiert (Abbildung 5B). Nach mikroskopischer Kontrolle des erfolgreichen Digestionsprozesses (Abbildung 6) wurde die Kollagenase durch Zugabe von PBS + 20 % fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom GmbH) neutralisiert und die Gefäßsuspension für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die sich dabei absetzende Fettschicht

konnte mittels einer Präzisionspipette abgesaugt werden (*Abbildung 5C*). Eine 3 – 5malige Wiederholung der Inkubations- und Absaugungsschritte sowie das anschließende Filtrieren über einen Filter der Porengröße 500 µm (pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland) ermöglichte es, verbliebenes unverdautes Gewebe zu entfernen und eine möglichst fettfreie Suspension aus mikrovaskulären Fragmenten zu erhalten. Um die isolierten Fragmente in Form eines Pellets anzureichern, wurde die Suspension bei 120 x g für 5 Minuten zentrifugiert und schließlich in PBS + 20 % FKS resuspendiert, um ein Verklumpen der Fragmente zu verhindern (*Abbildung 5D*).

### 5.2.2 Kultivierung

Die isolierten mikrovaskulären Fragmente wurden in den beiden Studienabschnitten der vorliegenden Arbeit auf folgende Weise kultiviert:

**Im ersten Studienabschnitt** wurde die Gefäßsuspension in drei äquivalente Teile fraktioniert und für 24 Stunden unter atmosphärischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in 1 % Agarose-beschichteten 24-Well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich), die mit 4 °C UW-Lösung (Belzer UW® Cold Storage Solution, Bridge to Life Ltd., Columbia, SC, USA) befüllt waren, kultiviert. Die UW-Lösung wurde je nach Versuchsgruppe mit Vehikel (PBS; Kontrollgruppe), 1 µM IGF-1 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) oder einer Kombination aus 1 µM IGF-1 + 0,5 µg/ml IGFbp4 (R&D Systems) supplementiert. Im Anschluss an die 24-stündige Kultivierungsphase wurden die Fragmente in PBS gewaschen und standen für *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Verfügung.

**Im zweiten Studienabschnitt** wurden die isolierten Gefäßfragmente analog zum ersten Studienabschnitt in IGF-1-supplementierter UW-Lösung kultiviert. Nach Ende der Kultivierungsperiode wurden die mikrovaskulären Fragmente in PBS gewaschen. Die eine Hälfte der mikrovaskulären Fragmente wurde anschließend kryokonserviert, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe diente und direkt für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

### 5.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die mikrovaskulären Fragmente in 10 µl PBS + 20 % FKS (Biochrom GmbH) resuspendiert und direkt in ein spezielles Röhrchen zur Kryokonservierung (Nalgene®, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) transferiert. Dieses wurde mit 1,8 ml vorgekühlter UW-Lösung (4 °C) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 50 % FKS befüllt. DMSO fungierte hierbei als Kryoprotektivum. Ein typischer Nebeneffekt des Gefrierprozesses einer wässrigen Lösung ist die Eiskristallbildung, die zu mechanischen Schäden bei Zellen führen kann [PEGG, 2002]. DMSO minimiert diese Zellschäden, indem es die flüssige Phase intrazellulär stabilisiert [MANDUMPAL et al., 2011]. Durch die langsame Zugabe des Kryoprotektivums wird sichergestellt, dass DMSO die Zellmembran zwar passieren kann, selbst aber keine osmotische Zellschädigung induziert [TAKAHASHI et al., 1985].

Die Probe wurde daraufhin in einen Einfrierbehälter überführt (Nalgene®, Fisher Scientific) und graduell bei -1 °C/min auf -80 °C heruntergekühlt. Unter diesen Bedingungen wurden die mikrovaskulären Fragmente für 24 Stunden gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung des gekühlten Kryoröhrchens in einen Stickstofftank, in welchem es für sechs Tage bei -196 °C aufbewahrt wurde. Nach der Lagerungszeit von sieben Tagen wurde das Röhrchen mit den Gefäßfragmenten aus dem Stickstofftank entnommen und bis zur makroskopischen Auflösung aller Eiskristalle in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von DMSO bei Raumtemperatur sollte das Agens nach dem Auftauungsprozess möglichst zügig entfernt werden [WOLFE & BRYANT, 2001]. Hierzu wurde die Probe bei 120 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Dieser Prozess wurde zweimalig wiederholt. Abschließend wurden die Gefäßfragmente in PBS mit 20 % FKS resuspendiert und für *in vitro* sowie *in vivo* Analysen eingesetzt.



## 5.3 *In vitro* Analysen

### 5.3.1 Durchflusszytometrie

Um den Einfluss einer 24-stündigen Kultivierung in Vehikel-, IGF1- bzw. IGF-1- + IGFbp4-supplementierter UW-Lösung in Hinsicht auf die zelluläre Zusammensetzung von mikrovaskulären Fragmenten genauer zu analysieren, wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie angewandt. Mittels Accutase® (BioLegend, Fell, Deutschland) erfolgte eine 30-minütige Digestion der mikrovaskulären Fragmente bei 37 °C in Einzelzellen. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend auf die Expression bestimmter Marker untersucht. Hierzu zählten der monoklonale Ratte-Anti-Maus Endothelzellmarker CD31-Phycoerythrin (PE), der monoklonale Ratte-Anti-Maus Perizytenmarker alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-PE und die monoklonalen Ratte-Anti-Maus Stroma-/Stammzelloberflächenmarker CD73-Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) und CD117-FITC (alle BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Isotyp-identisches Ratten IgG-PE und IgG-FITC (BD Pharmingen) dienten dabei als Kontrolle. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mittels eines FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Gewonnene Daten konnten mit dem Software-Paket CellQuest Pro (BD Biosciences) ausgewertet werden. Der Anteil der Marker-positiven Zellen wurde prozentual in Relation zur Gesamtzellzahl angegeben.

### 5.3.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Detektion von Proteinen. Hierbei ermöglicht es die Spezifität von Antigen-Antikörper-Interaktionen, die Expression bestimmter Targetproteine in Proben quantitativ nachzuweisen. Die Bezeichnung „*Western-Blotting*“ ist dabei auf BURNETTE [1981] zurückzuführen.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot die Expression von VEGF, VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) und Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) in kultivierten mikrovaskulären Gefäßfragmenten bestimmt.

### 5.3.2.1 Proteinextraktion

Die isolierten mikrovaskulären Fragmente wurden im Anschluss an die Kultivierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Extraktion der zu analysierenden Proteine wurden die Gefäßfragmente in einem Lyse-Puffer (10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH 7,5; 10 mM NaCl, 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 0,5 % Triton X-100; 0,02 % NaN<sub>3</sub>) sowie einer zusätzlichen Proteinase- und Phosphatase-Inhibitor Mischung (0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1:75 v/v Protease Inhibitor Cocktail, 1:100 v/v Phosphatase Inhibitor Cocktail 2; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während des Zellaufschlusses wurden Proteinasen und Phosphatasen freigesetzt. Durch Hinzufügen des Inhibitor-Gemisches wurde die enzymatische Spaltung der Proteine verhindert. Anschließend wurde die Suspension für 30 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland, 4 °C, 16 000 x g) und der gewonnene Überstand (Gesamtzell-Extrakt) abpipettiert.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode [LOWRY et al., 1951], welche auf einer Farbreaktion mit Folin-Ciocalteu's-Phenolreagenz und Kupfersulfat beruht. Hierbei wurden die Reagenzien A (10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/500 ml 0,1 M NaOH; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und B (0,5 g KNa-Tartrat, 0,25 g Cu(SO<sub>4</sub>)\*5H<sub>2</sub>O/50 ml Aqua dest.; Sigma-Aldrich) in einem Mischungsverhältnis von 50:1 zueinander gesetzt und 250 µl der erhaltenen Lösung mit 50 µl verdünntem Proteinextrakt (Protein/Aqua dest., 1:10) vermengt. Nach intensivem Mischen (Heidolph Reax top Vortex Mixer, Fisher Scientific) und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 25 µl verdünnte Folinlösung (Folinlösung/Aqua dest., 1:2, Sigma-Aldrich) hinzugegeben und der Ansatz wiederholt für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption des entstandenen Farbkomplexes wurde photometrisch (GeneQuant pro, Amersham Pharmacia BioTech, Freiburg, Deutschland) bei 595 nm gemessen. Eine BSA-Standardkurve diente zur Ermittlung der Proteinkonzentration.

Die Proteinextrakte wurden mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 2 µg Protein/µl verdünnt und mit einem Probenpuffer nach Laemmli (0,125 M TRIS-HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 20 % (v/v) Glycerin; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,004 % (w/v) Bromphenolblau; Sigma-Aldrich) versetzt, womit eine Linearisierung und konstante, negative Ladungsverteilung der Proteine erreicht werden konnte. Die Extrakte wurden für 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert.

### 5.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der denaturierten Proteinextrakte wurde mittels SDS-PAGE unter diskontinuierlichen Bedingungen nach LAEMMLI [1970] durchgeführt. Der Acrylamidanteil des Sammelgels betrug 5 %, der des Trenngels 10 % (30 % Acrylamid/Bis Solution, 29:1, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) (*Tabelle 1*).

Zusätze [ml]	Sammelgel 5%	Trenngel 10 %
30 % Acrylamid/Bis	0,67	3,3
Trenngelpuffer	-	2,5
Sammelgelpuffer	0,5	-
Aqua dest.	2,7	4,0
10 % SDS	0,04	0,1
10 % APS	0,04	0,1
TEMED	0,02	0,2

**Tabelle 1:** Pipettierschema für Polyacrylamidgele.

Das Beladungsvolumen entsprach 30 µg Protein je Geltasche. Entsprechend ihrer Molekülmasse wurden die Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, Bio-Rad) in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base; 0,96 M Glycin; 0,5 % (w/v) SDS; Carl Roth) aufgetrennt. Ein spezielles Netzgerät für stabilisierenden Gleichstrom (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories) generierte die hierfür erforderliche Niederspannung. Die Spannung betrug dabei 100 V während der

Proteinkonzentrierung im Sammelgel und 140 V bei der Passage der Proteine durch das Trenngel. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpufferbad nach Bjerrum-Schäfer-Nilson (48 mM TRIS Base, pH 9,2; 39 mM Glycin; Aqua dest. ad 1 l; 10 % (v/v) Methanol) äquilibriert.

#### *5.3.2.3 Proteintransfer*

Mittels Semi-Dry-Blot Verfahren (Trans-Blot® Turbo, Bio-Rad Laboratories) wurde das Proteinmuster aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (0,2 µm Porengröße, Bio-Rad Laboratories) übertragen. Schließlich wurde die proteinbeladene Membran über Nacht bei 4 °C in TBS-T Puffer (1,5 mM TRIS Base, pH 7,5; 1 % (w/v) NaCl; 0,01 % (v/v) Tween 20 in Aqua dest.; Carl Roth) aufbewahrt.

#### *5.3.2.4 Proteindetektion und quantitative Auswertung*

Um die Targetproteine zu detektieren, wurde eine Immunmarkierung mit anschließendem chemolumineszenten Nachweis angewandt. Zunächst erfolgte die Inkubation der membranassoziierten Proteine mit spezifischen unkonjugierten Primärantikörpern (*Tabelle 2*) über Nacht bei 4 °C und zusätzlich 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden 3-malig in TBS-T gewaschen und folgend mit entsprechenden HRP (horseradish peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörpern (1:1000; R&D Systems) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem 5-maligem Waschprozess in TBS-T wurde die Proteinexpression anhand einer verstärkten Chemilumineszenzreaktion visualisiert (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare) und mit Hilfe eines speziellen Kamerasystems (ChemoStar PC ECL & Fluorescence Imager, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) analysiert.

Die Auswertung erfolgte durch ein Quantifizierungsprogramm (Labimage 1D Gel and Blot Auswertesoftware, Intas Science Imaging Instruments). Um eine gleichmäßige Proteinbeladung und Normalisierung der Expressionslevel sicherzustellen, wurden alle erhobenen Daten anhand des internen  $\beta$ -Aktin-Standards (Tabelle 2) korrigiert.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
VEGF	Maus	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
VEGFR-2	Kaninchen	1:300	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
MMP-2	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -Actin	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich

**Tabelle 2:** Auflistung der eingesetzten Primärantikörper für die Western-Blot-Analyse.

## 5.4 Herstellung prävascularisierter Scaffolds

### 5.4.1 Prozessierung der Scaffolds

In der vorliegenden Arbeit dienten Scaffolds als strukturelles Gerüst für die Beladung mit mikrovaskulären Fragmenten. Als Ausgangsmaterial für die Prozessierung der Scaffolds wurde Integra® Dermal Regeneration Template Single Layer ohne Silikonschicht (Integra LifeSciences Corporation, Ratingen, Deutschland) verwendet. Dies ist ein synthetisches Dermisäquivalent, das aus bovinem Kollagen und Chondroitin-6-Sulfat besteht.

Das Biomaterial weist eine Porosität von 98 % und eine Porengröße von 20 – 120  $\mu\text{m}$  auf. Für die Experimente wurden Scaffolds aus der Integra®-Matrix in zylindrischer Form (Durchmesser: 3 mm, Höhe: 1 mm) ausgestanzt (Biopsiestanze Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland) und mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelt.

### 5.4.2 Besiedlung der Scaffolds mit mikrovaskulären Fragmenten

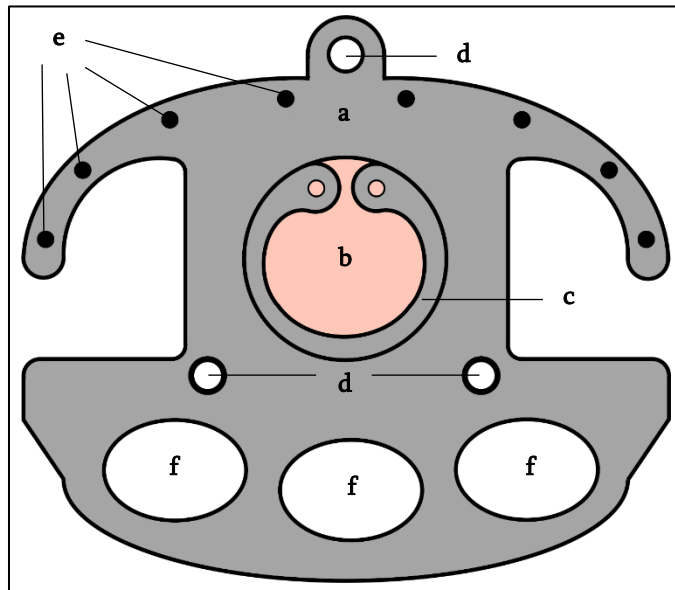
Im Anschluss an die 24-stündige Kultivierung der Gefäßfragmente bzw. einer anschließenden Kryokonservierung erfolgte die Besiedlung der Scaffolds. Die Scaffolds wurden zu diesem Zweck auf ein Zellsieb positioniert (Maschenweite: 500 µm, pluriSelect Life Science). Im nächsten Schritt wurden die Gefäßfragmente in 10 µl PBS resuspendiert und auf die Oberfläche der Scaffolds pipettiert (100 µl Pipette, Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf, Deutschland). Anschließend wurde auf der Unterseite der Matrices eine 1 ml-Spritze (BD Plastipak; BD Biosciences) angesetzt und Unterdruck erzeugt, um eine möglichst homogene Beladung der Scaffolds mit Gefäßfragmenten zu erreichen. Die so prävascularisierten Integra®-Scaffolds wurden schließlich in die Rückenhautkammern von Empfängertieren implantiert.

## 5.5 Modell der Rückenhautkammer

### 5.5.1 Präparation der Rückenhautkammer

Die Präparation der Rückenhautkammer (*Abbildung 7*) in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen fand unter Allgemeinanästhesie statt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere vor Beginn des mikrochirurgischen Eingriffs mittels i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG; Ursotamin®, Serumwerke Bernburg AG) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG; Rompun®, Bayer) narkotisiert. Das Operationsgebiet wurde durch Elektrorasur (Elektra II GH 204, Aesculap) und anschließender chemischer Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) enthaart. Danach wurde die Rückenhautkammer mit warmem Wasser gereinigt und mit Alkohollösung (Softasept N, Braun) desinfiziert.

Anschließend wurde das Tier in Bauchlage positioniert, die Rückenhaut median angehoben und durch je einen Haltefaden cranial und caudal fixiert. Währenddessen konnte mit Hilfe einer Gegenlichtquelle der Verlauf der rückenhautversorgenden Hauptgefäße dargestellt werden. So konnte sichergestellt werden, dass die Gefäße im Verlauf der Operation weder zu stark komprimiert noch verletzt wurden und das Gewebe suffizient durchblutet war.

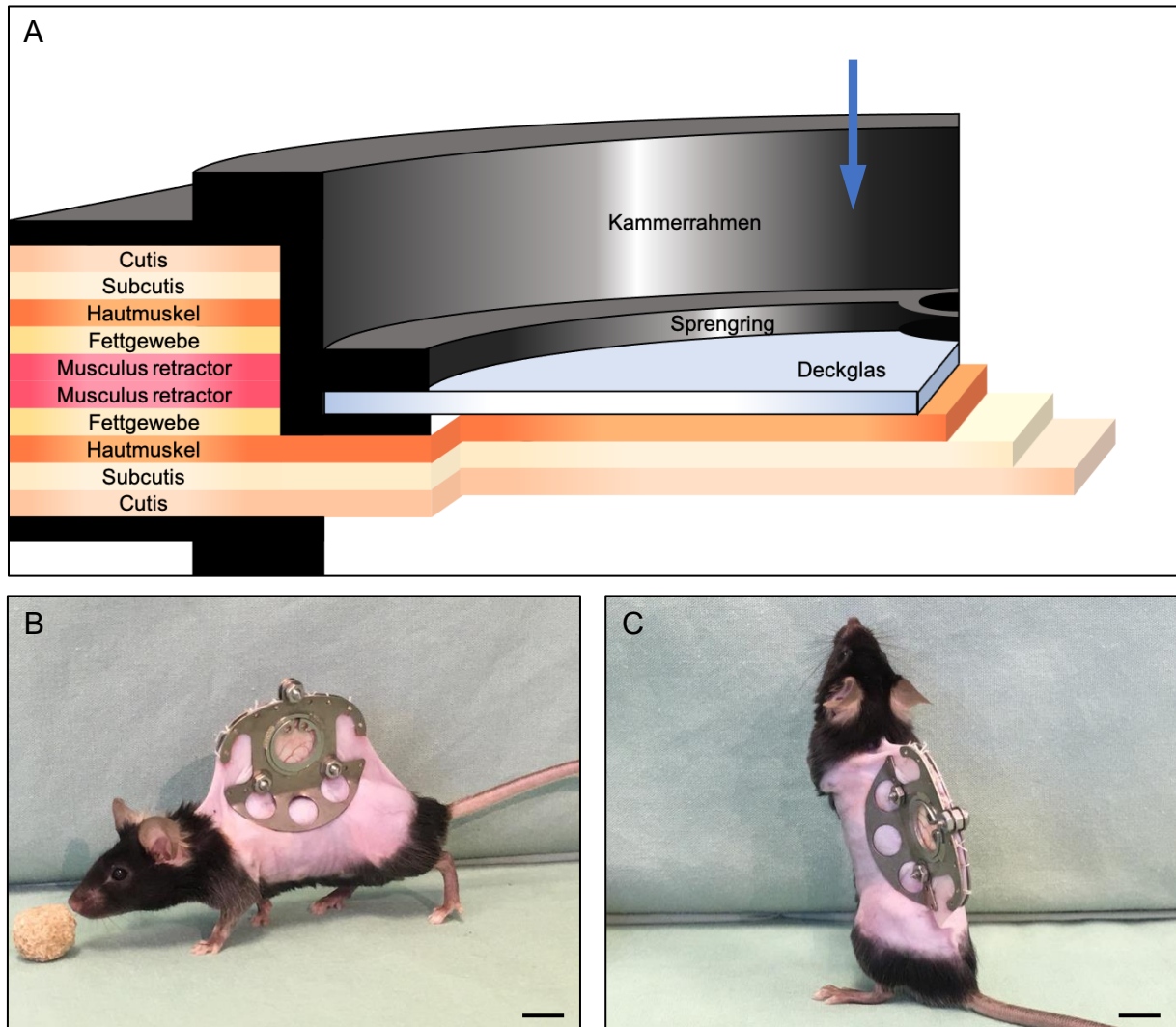


**Abbildung 7:** Schematische Darstellung einer Rückenhautkammer. a = Kammerrahmen; b = Beobachtungsfenster zum Rückenhautgewebe mit aufliegendem Deckglas; c = Sprengring zur Fixation des Deckglases; d = Bohrlöcher für Schrauben; e = Bohrlöcher für Fixationsnähte; f = Aussparungen zur Gewichtsreduktion der Kammer.

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen (Irola Industriekomponenten GmbH & Co. KG, Schonach, Deutschland), die durch drei Schrauben miteinander verbunden werden. Zunächst wurde der rückwärtige Kammerrahmen über dessen Fixationsbohrungen am Oberrand der Hautfalte angenäht. Wichtig war dabei die Sicherstellung einer korrekten Position der Rückenhautkammer, um das Tier in seinen Bewegungen nicht einzuschränken und ein frühzeitiges Abkippen der

Rückenhautkammer zu vermeiden. Im basalen Bereich der Hautfalte erfolgten mittels Skalpells zwei Inzisionen für die Befestigungsschrauben des Kammerrahmens. Anschließend wurden auf die Schrauben Präparierklemmen gesetzt, um eine kontinuierliche Fixation des Rahmens und eine adäquate Spannung des Operationsfeldes während des mikrochirurgischen Eingriffes zu garantieren.

Unter erneuter Gegenlichtkontrolle wurde auf der vorderen Hautfaltenseite ein Areal von etwa 15 mm für das spätere 11 mm große Beobachtungsfenster markiert. Dabei wurde ein größerer Durchmesser als das eigentliche Beobachtungsfenster gewählt, um nach der Montage des vorderen Kammerrahmens eine Kompression des darunterliegenden Gewebes zu vermeiden. Somit konnte eine physiologische Durchblutung des Gewebes innerhalb des Beobachtungsfelds sichergestellt werden. Die Haltefäden wurden anschließend entfernt und die Maus in Seitenlage positioniert. Unter Verwendung eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leica, Wetzlar, Deutschland) wurde im markierten Bereich die Cutis, die Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel (*Musculus panniculus carnosus*) sowie die ipsi- und kontralaterale Schicht des *Musculus retractors* und Fettgewebes entfernt. So wurden im Beobachtungsfenster die Gewebeschichten der kontralateralen Seite, bestehend aus Cutis, Subcutis und quergestreiftem Hautmuskel, erhalten (Abbildung 8A).



**Abbildung 8:** **A:** Querschnitt durch die verschiedenen Gewebeschichten der Rückenhautfalte (links in der Abbildung) und die präparierte Rückenhautkammer (Bildmitte). Der freigelegte Hautmuskel wird durch das Deckglas vor mechanischen Einwirkungen, Verunreinigungen und Dehydratation geschützt. Durch einen Sprengring wird das Deckglas im Kammerrahmen fixiert. Der Pfeil markiert die Blickrichtung während der auflichtmikroskopischen Untersuchung. **B, C:** C57BL/6 Maus 48 h nach Implantation der Rückenhautkammer in lateraler Ansicht (B) und Ansicht von dorsal (C). Maßstab: 10 mm.

Nach Spülung der verbliebenen Gewebeschichten mit 10 ml Kochsalzlösung erfolgte die Montage des vorderen Kammerrahmens. Im Abstand von etwa 500  $\mu\text{m}$  vom gegenseitigen Rahmen konnte dieser mit Stahlmuttern auf den Verbindungsschrauben fixiert werden. Hierbei wurde eine Stahlmutter als Spacer zwischen den Titanrahmen auf die Verbindungsschraube aufgezogen. Dies verhinderte eine Gewebekompression zwischen den Kammerrahmen, um die Durchblutung der Rückenhaut nicht zu gefährden.

Unter Ausschluss von Luftblasen wurde das Deckglas dem Beobachtungsfenster aufgesetzt. Durch Adhäsion haftete dieses an den

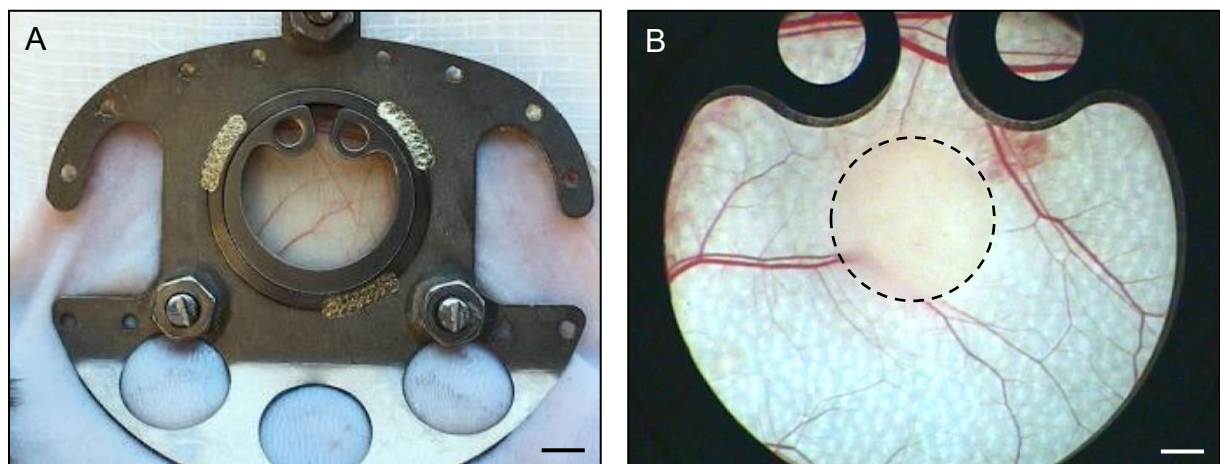


freipräparierten Muskel und wurde durch Anbringen eines Sprenglings zusätzlich gesichert. Deckglas und Sprengling konnten zu jeder Zeit wieder entfernt werden.

Die Tiere konnten sich postoperativ für 48 Stunden von Narkose und chirurgischem Trauma erholen. Ein regelrechtes Putz-, Fress- und Schlafverhalten zeigte, dass die Mäuse die Rückenhautkammer gut tolerierten (*Abbildung 8B, C*).

### 5.5.2 Implantation prävaskularisierter Scaffolds

Die Implantation der prävaskularisierten Scaffolds erfolgte 48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer am narkotisierten Tier. Dieses wurde hierfür seitlich auf einer Plexiglasbühne fixiert. Zunächst wurden der Sprengling und das Deckglas entfernt, um Zugang zum freigelegten Gewebeareal zu erhalten. Nachfolgend konnte unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leica) ein prävaskularisiertes Scaffold vorsichtig in das Zentrum des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer platziert werden.



**Abbildung 9:** **A:** Übersichtsaufnahme einer Rückenhautkammer. Maßstab: 2,8 mm **B:** Stereomikroskopische Aufnahme des Beobachtungsfensters einer Rückenhautkammer unter Gegenlicht nach Implantation eines prävaskularisierten Scaffolds (Rand markiert durch gestrichelte Linie). Maßstab: 0,8 mm.

Um beim Verschluss der Kammer eine optimale Adhäsion des Deckglases zu gewährleisten und eine Bildung von Luftblasen auszuschließen, wurden wenige Tropfen 0,9 %-iger Kochsalzlösung (Braun) in die Kammer pipettiert. Deckglas sowie Sprengling wurden aufgesetzt und der Sitz des Implantats abschließend unter stereomikroskopischer Sicht kontrolliert (*Abbildung 9*). Während der Präparation

wurde darauf geachtet, gewebeschonend zu arbeiten, um Irritationen, Manipulationen oder Verletzungen des Gewebes oder des Implantats zu verhindern. Für die Dauer des anschließenden Versuchszeitraums von 14 Tagen blieb die Kammer verschlossen.

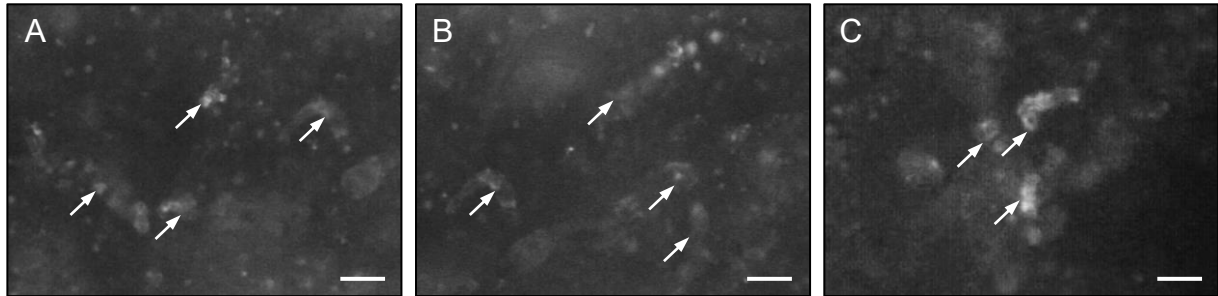
## 5.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Mikroskopie wurde erstmals im 19. Jahrhundert von Rudolf Wagner und Julius Friedrich Conheim beschrieben und bezeichnet ein Verfahren zur Darstellung von dynamischen Prozessen im lebenden Organismus [SUMEN et al., 2004]. In vorliegender Arbeit ermöglichte diese Untersuchungstechnik, die fortschreitende Vaskularisierung der implantierten Scaffolds innerhalb der Rückenhautkammern über einen 2-wöchigen Zeitraum zu verfolgen und repetitiv mikrohämodynamische Parameter zu erfassen.

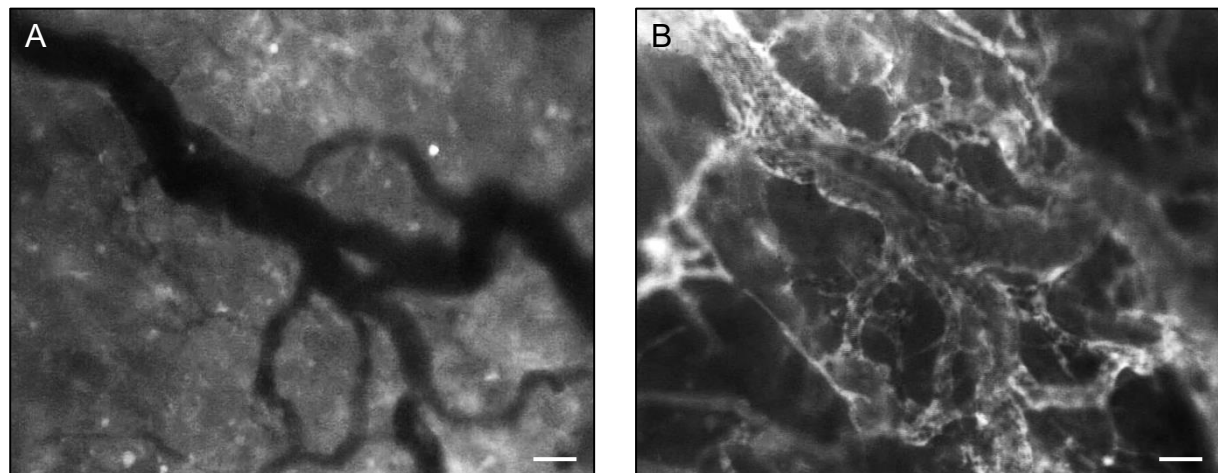
Die Tiere wurden am jeweiligen Untersuchungstag mittels i.p. Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Ursotamin®, Serumwerke Bernburg AG) und Xylazin (25 mg/kg KG; Rompun®, Bayer) narkotisiert und auf einer Plexiglasbühne fixiert, sodass das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer frei zugänglich in horizontaler Lage positioniert war. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung eines modifizierten Zeiss Axiotech Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer 100 Watt Quecksilberdampflampe und einem zwischengeschalteten Filterblock ausgestattet, der je nach Einstellung die Emission von Licht der Wellenlänge 330 – 390 nm (ultraviolett), 450 – 490 nm (blau) und 530 – 560 nm (grün) ermöglichte.

Zunächst wurden Nativaufnahmen der Scaffolds angefertigt, wobei kein Kontrastmittel zum Einsatz kam. Dieser Schritt diente der Verifizierung eines erfolgreichen Transfers der GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente auf die Scaffolds (*Abbildung 10A – C*). Hierbei wurde das Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer unter Blaulicht-Epi-Illumination analysiert, sodass die implantierten GFP<sup>+</sup> Gefäße angeregt wurden und fluoreszierten. Daraufhin wurde den Tieren zur Darstellung des Gefäßsystems 0,1 ml Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran 150 kDa (5 %; Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Es wurde ein FITC-Dextran von 150 kDa gewählt, weil dieses aufgrund seines Molekulargewichts überwiegend intravasal

verbleibt und dank seiner kontrastverstärkenden Eigenschaften ideal als Plasmamarker genutzt werden kann [FAYE et al., 2012]. Auf diese Weise konnte unter Blaulicht-Epi-Illumination das perfundierte Gefäßsystem der Maus dargestellt werden (Abbildung 11).



**Abbildung 10: A – C:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination) von prävascularisierten Scaffolds am Tag der Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Pfeile = GFP<sup>+</sup> mikrovaskuläre Gefäßfragmente. Die Gefäßfragmente wurden für 24 h bei 4 °C in Vehikel- (A), IGF-1- (B) oder IGF-1 + IGFbp4- (C) supplementierter UW-Lösung kultiviert. Maßstab: 45 µm.

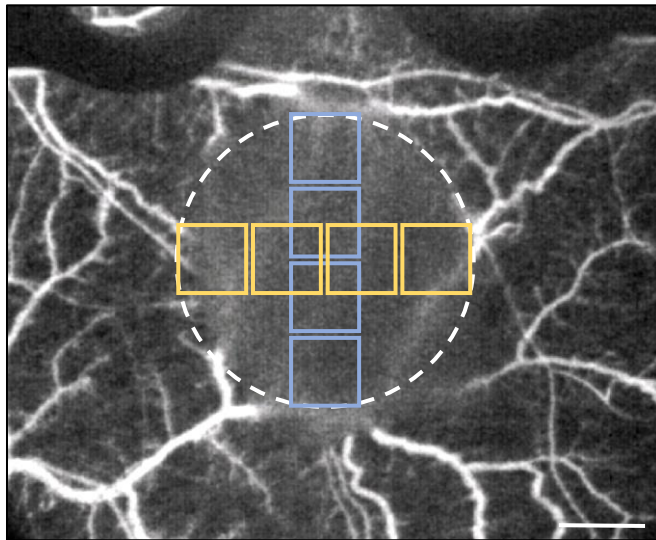


**Abbildung 11:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination) des Gefäßnetzwerks im Zentrum eines Scaffolds an Tag 10 nach Implantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6 Maus vor (A) und nach (B) retrobulbärer Injektion von 0,1 ml FITC-markiertem Dextran 150 kDa. Maßstab: 26 µm.

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Charge-Coupled Device (CCD) Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet und über einen Rekorder (DVD-HR775; Samsung Electronics, Seoul, Südkorea) auf DVD gesichert, um sie off-line zu einem späteren Zeitpunkt auswerten zu können. Parallel zur Mikroskopie wurden die mikroskopischen Bilder auf einem 14-Zoll Videomonitor (Trinitron; Sony, Tokio, Japan) angezeigt. Über 5x, 10x und 20x Objektive mit langem Arbeitsabstand konnten Vergrößerungen von x115, x230 und

x460 auf dem Monitor erreicht werden. Zusätzlich wurden die Videosequenzen mittels Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) beschriftet, um eine korrekte Zuordnung zu den Versuchstieren und Beobachtungszeitpunkten für die off-line Auswertung sicherzustellen.

### 5.6.1 Mikrozirkulatorische Analysen



**Abbildung 12:** Lage der 8 ROIs. Intravital-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (in Blaulicht-Epi-Illumination) mit dem 20x Objektiv in vertikaler (blau) sowie horizontaler (gelb) Richtung innerhalb des Scaffolds (Markierung des Rands durch gestrichelte Linie). Maßstab: 870  $\mu\text{m}$ .

Während des 2-wöchigen Beobachtungszeitraums wurden bei allen Untersuchungen Videoaufnahmen erstellt, die im Anschluss off-line abgespielt und mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Cap-Image (Version 6.02; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) computer-assistiert analysiert werden konnten. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen von acht standardisiert festgelegten Arealen (Abbildung 12; regions of interest (ROIs); Größe: 0,4 mm<sup>2</sup>) erfolgten unmittelbar nach Implantation der Scaffolds (Tag 0)

sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Die Einteilung der ROIs war bei jedem Versuchstier und an jedem Untersuchungstag deckungsgleich, um die erhobenen Messdaten miteinander vergleichen zu können.

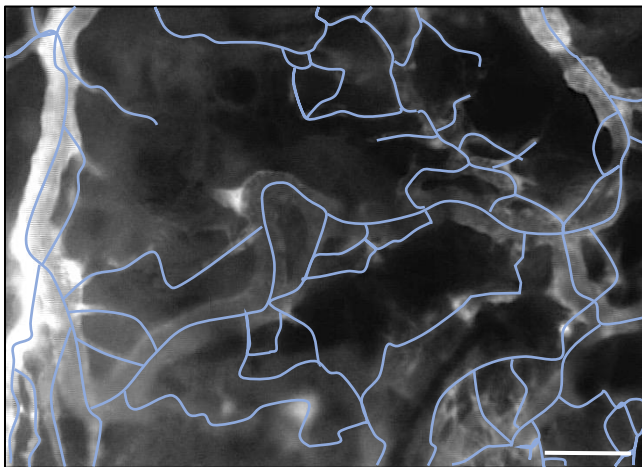
Folgende mikrozirkulatorische Parameter wurden dabei erfasst:

- *Perfundierte ROIs (5.6.1.1)*
- *Funktionelle Kapillardichte (5.6.1.2)*
- *Gefäßdurchmesser (5.6.1.3)*
- *Blutzellgeschwindigkeit (5.6.1.4)*
- *Scherrate (5.6.1.5).*

### 5.6.1.1 Perfundierte ROIs

Die Bestimmung der perfundierten ROIs ermöglichte eine erste Einschätzung der Vaskularisierung der Implantate. Eine ROI wurde als perfundiert gewertet, wenn darin mindestens ein Gefäß mit nachweisbarem Blutfluss vorzufinden war. Zwischen GFP<sup>+</sup> reperfundierten mikrovaskulären Fragmenten des Spendertieres und neu einwachsenden GFP<sup>-</sup> Gefäßen des Empfängertieres wurde dabei nicht unterschieden. Der so ermittelte Anteil bereits perfundierten ROIs von den insgesamt acht ROIs wurde in Prozent angegeben.

### 5.6.1.2 Funktionelle Kapillardichte



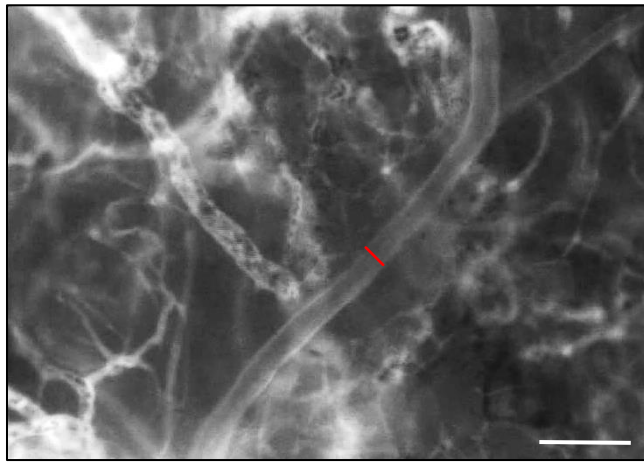
**Abbildung 13:** Analyse der funktionellen Kapillardichte mit Hilfe des Analyseprogramms Caplimage. FITC-Dextran 150 kDa-markierte Gefäße einer ROI werden nachgezeichnet (blau). Durch die Software wird dann die Gefäßdichte ermittelt. Maßstab: 70  $\mu\text{m}$ .

Die funktionelle Kapillardichte ist definiert als die Länge (in cm) aller perfundierten Gefäße innerhalb einer ROI (in  $\text{cm}^2$ ) und wird in  $[\text{cm}/\text{cm}^2]$  bzw.  $[\text{cm}^{-1}]$  angegeben. Miteingerechnet wurden nur Gefäße mit nachweisbarem Blutfluss, was an vorbeiströmenden Erythrozyten im FITC-Dextran 150 kDa-angereicherten Blutplasma erkennbar war. Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurde jede ROI nachträglich im Standbild analysiert.

Unter Verwendung des Analyseprogramms Caplimage (Dr. Zeintl) wurden hierbei alle perfundierten Gefäße nachgezeichnet (*Abbildung 13*) und durch die vordefinierte Fläche der ROIs dividiert.



### 5.6.1.3 Gefäßdurchmesser



**Abbildung 14:** Analyse des Gefäßdurchmessers mit Hilfe des Analyseprogramms CapImage. Senkrecht verlaufende Verbindung der Gefäßränder eines FITC-Dextran 150 kDa-markierten Gefäßes mit einer Messlinie (rot). Durch die Software wird anhand dieser Linie der Gefäßdurchmesser ermittelt. Maßstab: 70  $\mu\text{m}$

Durch die Markierung des Blutplasmas mit FITC-Dextran 150 kDa konnte das Gefäßsystem klar vom umliegenden unmarkierten Gewebe abgegrenzt werden. Dies ermöglichte die Bestimmung der Durchmesser (in  $\mu\text{m}$ ) einzelner Gefäße. Hierfür wurde im Videostandbild eine senkrecht zum Gefäß verlaufende Strecke gezogen, die von einem Randpunkt des Gefäßes zum gegenüberliegenden Randpunkt reichte (Abbildung 14).

Zum Zweck der Randomisierung wurden nur Gefäße analysiert, welche eine quer durch die ROI verlaufende Diagonale schnitten. Auf diese Weise wurde von 30 Gefäßen pro ROI der Durchmesser erhoben.

### 5.6.1.4 Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit wurde bei den identischen 30 Gefäßen pro ROI gemessen, an denen zuvor der Gefäßdurchmesser bestimmt worden war. Zur Anwendung kam dabei die computergestützte Line-Shift-Diagramm-Methode [KLYSCZ et al., 1997]. Im Standbild wurde hierbei eine Messlinie zentral in das Gefäßlumen eingezeichnet und in Richtung des Blutstroms ausgerichtet. Anschließend wurde die DVD für ca. zehn Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während des festgelegten Zeitintervalls wurde für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem separaten Bildspeicher aufgezeichnet. Auf diese Weise konnte vom Auswerte-Programm aus allen Grauwertstufen ein Line-Shift-Diagramm erstellt werden. Das Diagramm zeigte eine Abfolge von schrägverlaufenden Linien unterschiedlicher Graustufen, wobei Erythrozyten durch dunkle Linien und Plasmalücken durch helle widerspiegelt

wurden. Aus dem Mittelwert der Steigungen dieser Linien konnte die Blutzellgeschwindigkeit (in  $\mu\text{m/s}$ ) errechnet werden.

#### 5.6.1.5 Scherrate

Die Scherrate ( $y$ ) beschreibt den Gradienten der Fließgeschwindigkeit in transversaler Richtung und gibt Auskunft über die Scherkräfte, welche auf die Gefäßinnenwand wirken [EFSTATHOPOULOS et al., 2008]. Diese Reibungskräfte können Endothelzellen über die Freisetzung pro-angiogener Faktoren zur Proliferation anregen und folglich die Angiogenese fördern [GALIE et al., 2014; BOLDOCK et al., 2017]. Die Berechnung der Scherrate erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach folgender Gleichung:

$$y = 8 * v/d$$

$y$  = Scherrate;  $v$  = Blutzellgeschwindigkeit;  $d$  = Durchmesser des Einzelgefäßes

#### 5.6.2 Abschluss der *in vivo* Untersuchungen

Die letzte intravitalmikroskopische Analyse wurde an Tag 14 nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds durchgeführt. Die Tiere wurden nach Beendigung der Aufnahmen durch eine Überdosis Anästhetikum und anschließender zervikaler Dislokation euthanasiert. Die Scaffolds wurden mitsamt des umliegenden Kammergewebes exzidiert und in Formaldehydlösung fixiert.

### 5.7 Histologie und Immunhistochemie

Das exzidierte Rückenhautkammergewebe einschließlich der Implantate diente histologischen und immunhistochemischen Analysen. Zusätzlich wurden im Rahmen des ersten Studienabschnitts präkultivierte Gefäßfragmente in 200  $\mu\text{m}$  Fibrin (Hepato-Prest®, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Frankreich) eingebettet und in Analogie zum exzidierten Gewebe immunhistochemisch aufbereitet. Sämtliche Proben

wurden zunächst für mindestens 24 Stunden in 4 %-iger Formaldehydlösung (Carl Roth) bei 20° C fixiert. Anschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und 3-µm dicke Serienschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mit verschiedenen Färbeverfahren behandelt, die unter 5.7.1 bis 5.7.4 detaillierter erläutert werden. Sämtliche histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Mikroskopsystems BX60 (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

### 5.7.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Das exzidierte Gewebe aus den Rückenhautkammern wurde zunächst nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Dieses Verfahren setzt sich aus zwei Einzelfärbungen zusammen, wobei azidophile Strukturen rot sowie basophile blau markiert werden [AVWIORO, 2011].

Anhand der HE-Färbung konnten die vaskularisierten Scaffolds, deren Inkorporation in das umliegende Rückenhautkammergebe sowie neu infiltriertes Granulationsgewebe visualisiert und histomorphologisch beurteilt werden.

### 5.7.2 Sirius Red-Färbung

Die Sirius Red-Färbung ist eine histologische Technik zur selektiven Darstellung von Kollagennetzwerken. Das Prinzip der Färbung basiert auf der Interaktion der Sulfonsäuregruppen des Farbstoffes Sirius Red und der basischen Gruppen der Kollagenmoleküle. Die Farbstoffmoleküle lagern sich parallel der Kollagenfasern an und verstärken dadurch deren doppelbrechende Eigenschaft [PUCHTLER et al., 1973; JUNQUEIRA et al., 1979]. Dies ermöglicht in Kombination mit einer Polarisationsmikroskopie eine selektive Detektion von Kollagenfasern und einen Rückschluss auf den Kollagengehalt des untersuchten Gewebes. Kollagene Fasern vom Typ I erscheinen bei dieser Methode gelb bis rötlich, Typ II Kollagen dagegen grün, was auf die unterschiedliche Faserdicke sowie die Dichte der angelagerten Farbstoffmoleküle zurückzuführen ist [JUNQUEIRA et al., 1978; DAYAN et al., 1989].

Nach erfolgter Sirius Red-Färbung wurden die Schnitte der Rückenhautkammern unter polarisiertem Licht dargestellt und mittels digitaler



Bildanalysesoftware (cellSens Dimension 1.11, Olympus) analysiert. Von 6 ROIs innerhalb eines Scaffolds sowie von 2 ROIs der normalen Haut der Maus wurden Aufnahmen erstellt. Innerhalb einer ROI wurde durch die Bildanalysesoftware die Fläche der Sirius Red-positiven kollagenen Fasern erfasst und als Prozentsatz der Gesamtfläche der ROI angegeben. Anschließend wurde der Mittelwert der Sirius-Red positiven Flächen innerhalb der Scaffolds sowie innerhalb der Haut berechnet und die Mittelwerte in Relation zueinander gesetzt. Dies erlaubte eine quantitative Bestimmung der Inkorporation der Scaffolds in das Rückenhautkammergebe [FRUEH et al., 2017a].

### 5.7.3 CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung

Um die Vaskularisierung innerhalb des exzidierten Rückenhautkammergebes sowie der implantierten Scaffolds analysieren zu können, wurde eine CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Der Endothelzellmarker CD31 markierte dabei alle Endothelzellen im Gewebeschnitt unabhängig ihres Ursprungs. Die GFP-Fluoreszenzfärbung erlaubte hingegen die selektive Darstellung von GFP<sup>+</sup> Gefäßen, die von den Gefäßfragmenten der transgenen Spendertiere abstammten. GFP<sup>+</sup> Gefäße waren entsprechend auf einwachsende Gefäße des Empfängertieres zurückzuführen.

Endothelzellen wurden unter Verwendung eines monoklonalen Ratte-Anti-Maus CD31-Primärantikörpers (1:100; dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) markiert, welcher von einem Ziege-Anti-Ratte Alexa555-Sekundärantikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) detektiert werden konnte. Im Anschluss an die CD31-Fluoreszenzfärbung wurden die Schnitte für eine Stunde in einer Plastikkuvette mit 0,05 % Citraconsäurehydrid-Puffer (pH 7,4; Sigma-Aldrich) bei 98 °C erhitzt und dann bei Raumtemperatur abgekühlt. Um das GFP-Signal zu verstärken, erfolgte über Nacht die Inkubation mit einem polyklonalen Ziege-Anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland) als zweiten Primärantikörper. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte bei 37 °C in einem Wasserbad (GFL 1083; GFL, Burgwedel, Deutschland) für zwei Stunden mit einem Biotin-markierten Esel-Anti-Ziege-Sekundärantikörper (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) inkubiert. Dieser Sekundärantikörper konnte durch Alexa488-markiertes Streptavidin (1:50; Vector

Labs, Burlingame, CA, USA), welches unter Anregungslicht grün fluoresziert, detektiert werden. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) ultraviolett angefärbt. Die Dichte mikrovaskulärer Netzwerke (Anzahl der CD31<sup>+</sup>-Gefäße/Fläche; mm<sup>-2</sup>) sowie der Anteil von GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> Gefäßen (% aller Gefäße) wurden sowohl innerhalb der Scaffolds als auch im angrenzenden Kammergewebe bestimmt. Je Implantat wurde dabei ein repräsentativer Schnitt ausgewertet.

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

Um die Wirkung von IGF-1 auf die Zellviabilität sowie Zellproliferation mikrovaskulärer Fragmente genauer zu analysieren, wurden im Rahmen des ersten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit isolierte Gefäßfragmente direkt nach Kultivierung in Vehikel-, IGF-1- bzw. IGF-1- + IGFbp4-supplementiertem Medium in Fibrin eingebettet und verschiedenen immunhistochemischen Färbungen unterzogen. Dabei wurde eine CD31-Casp-3- und eine CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Casp-3 ist eine Effektor-Caspase, die nach proteolytischer Spaltung aus der inaktiven Vorstufe Procaspase-3 hervorgeht und eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose einnimmt. Die Aktivierung des Zymogens kann über einen intrinsischen oder extrinsischen Signalweg initiiert werden und resultiert in finalen Apoptoseprozessen, wie der Chromatinkondensation, der DNA-Fragmentierung und der Bildung von Apoptosekörperchen [THORNBERRY et al., 1998; BUDIARDJO et al., 1999]. Der immunhistochemische Nachweis von Casp-3 ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die Detektion apoptotischer Zellen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente.

Für die Detektion proliferierender Zellen wurde eine CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Ki67 fungiert hierbei als Proliferationsmarker, da er in teilungsaktiven Phasen des Zellzyklus nachgewiesen werden kann und somit Rückschlüsse auf die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation erlaubt [GERDES, 1990]. Zunächst wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit einem monoklonalen Ratte-Anti-Maus-Antikörper (1:100; dianoVA GmbH) als Primärantikörper gegen CD31 inkubiert. Am folgenden Tag fand die Inkubation mit dem entsprechenden zweiten Primärantikörper statt. Hierbei wurde ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Casp-3-

Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt am Main) bzw. ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörper (1:500; Abcam, Cambridge) verwendet. Anschließend wurden die passenden Sekundärantikörper zugegeben. Mittels eines Ziege-Anti-Ratte IgAlexa488-Antikörpers (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH) wurden die CD31-Signale detektiert. Ein biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (gebrauchsfertig; Abcam) wurde für die Bindung an die Casp-3- bzw. Ki67-Primärantikörper eingesetzt und konnte durch Alexa555-markiertes Streptavidin (1:50; Thermo Fisher Scientific GmbH) nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) angefärbt.

Mit Hilfe dieser immunhistochemischen Verfahren konnte der Anteil von Casp-3<sup>+</sup>- und Ki67<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Gefäßfragmente quantitativ bestimmt werden. Der Endothelzellmarker CD31 ermöglichte dabei die Einteilung in CD31<sup>+</sup> Endothelzellen und CD31<sup>-</sup> perivaskuläre Zellen. Je Scaffold wurden mindestens 200 Endothelzellen und 200 perivaskuläre Zellen analysiert. Die Angabe der Marker-positiven Zellen erfolgte in Prozent der jeweiligen Zellpopulation.

## 5.8 Experimentelles Protokoll

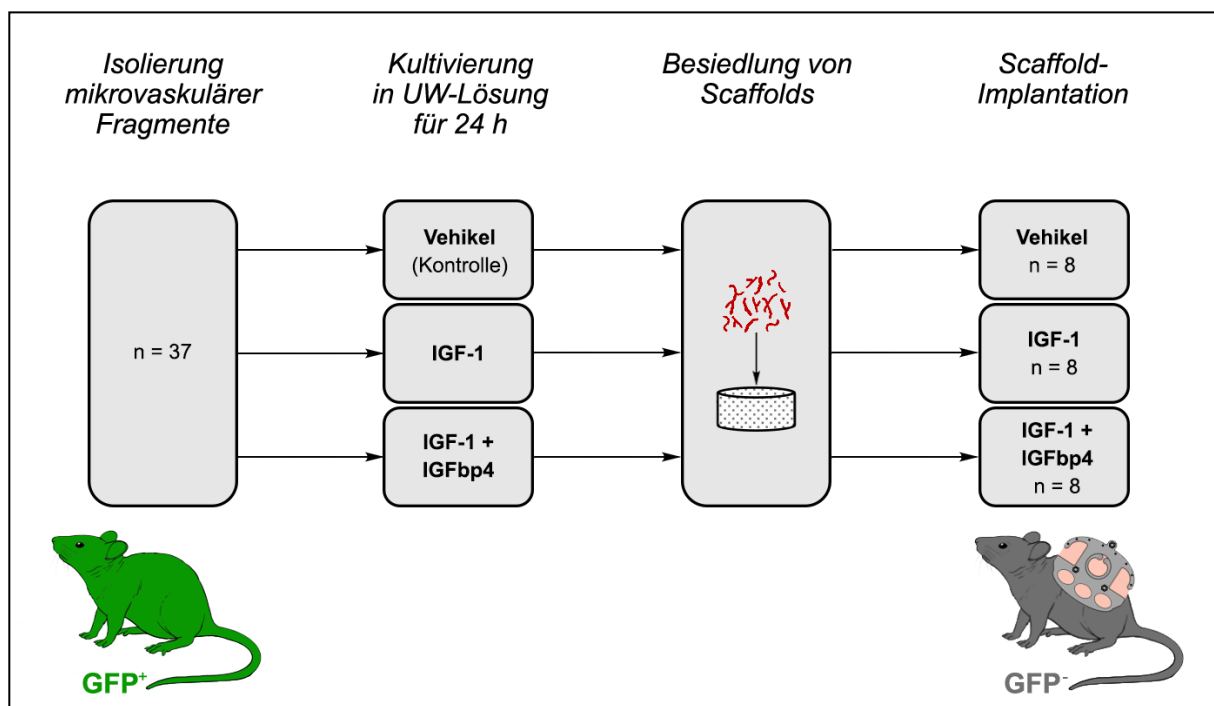
### 5.8.1 *In vitro* Versuchsgruppen

Im **ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurden für sämtliche *in vitro* Analysen mikrovaskuläre Gefäßfragmente aus dem epididymalen Fettgewebe von 54 C57BL/6 Spendermäusen isoliert und zu gleichen Teilen für 24 Stunden in Vehikel-, IGF-1 oder IGF-1 + IGFbp4-supplementiertem Medium inkubiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Gefäßfragmente hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung (n = 3 pro Gruppe) sowie ihrer Proteinexpression, Viabilität und proliferativen Aktivität (jeweils n = 4 pro Gruppe) untersucht.

### 5.8.2 *In vivo* Versuchsgruppen

Im Rahmen der *in vivo* Analysen beider Studienabschnitte wurden mikrovaskuläre Fragmente aus dem epididymalen Fettgewebe von insgesamt 58 transgenen GFP<sup>+</sup> C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Os/J Spendertieren isoliert.

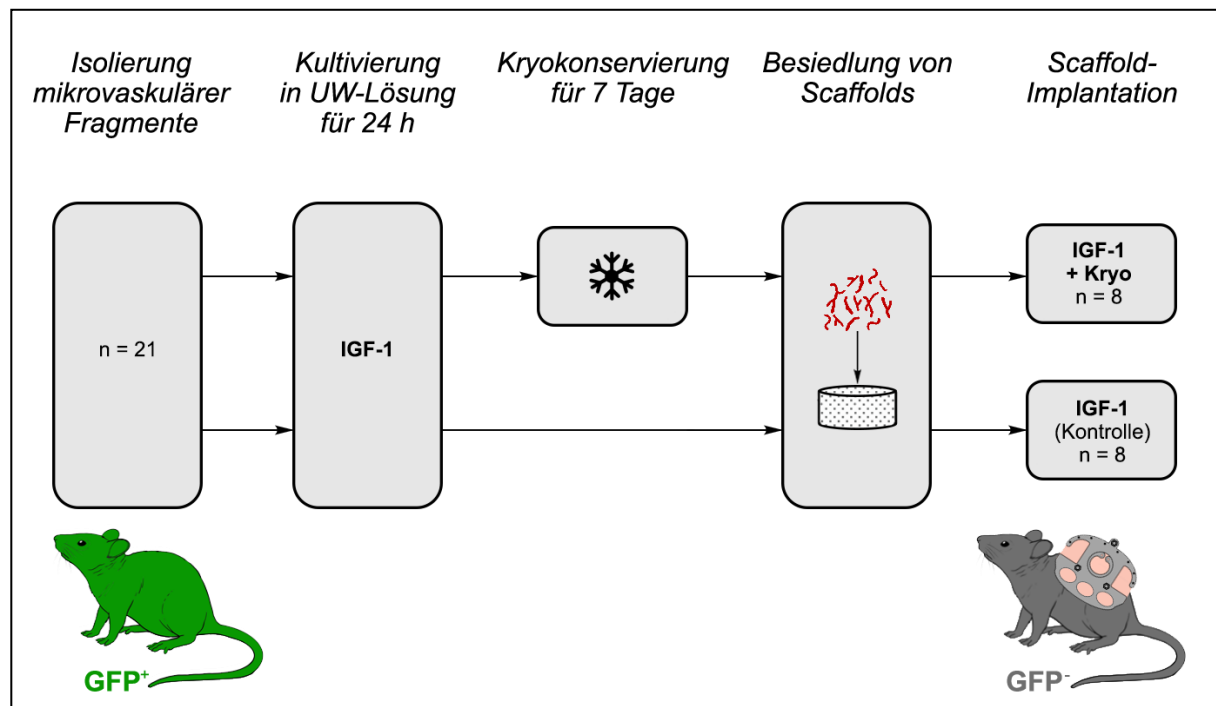
Im **ersten Studienabschnitt** erfolgte die Isolierung der mikrovaskulären Fragmente aus dem Nebenhodenfettgewebe von 37 GFP<sup>+</sup> Mäusen (*Abbildung 15*). Dabei wurden insgesamt 24 ml epididymales Fettgewebe gewonnen. Aus je 1 ml Fettgewebe wurden mikrovaskuläre Fragmente für die Besiedlung von einem Scaffold isoliert. Die Gefäßfragmente wurden anschließend auf drei gleich große Versuchsgruppen verteilt (n = 8 pro Gruppe) und entsprechend in Vehikel-, IGF-1- oder IGF-1 + IGFbp4-supplementierter UW-Lösung kultiviert. Darauf folgte die Besiedlung von Scaffolds mit den Fragmenten und die Implantation der prävascularisierten Matrices in die Rückenhautkammer von insgesamt 24 GFP<sup>-</sup> C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (n = 8 pro Gruppe) (*Abbildung 15*).



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der *in vivo* Versuchsgruppen und Behandlungsverfahren des ersten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit im zeitlichen Verlauf von links nach rechts.

Im **zweiten Studienabschnitt** wurden die Gefäßfragmente aus dem Nebenhodenfettgewebe von 21 GFP<sup>+</sup> Spendertieren gewonnen (*Abbildung 16*). Insgesamt wurden 16 ml epididymales Fettgewebe gewonnen. Pro Scaffold wurde 1 ml Fettgewebe für die Isolierung der mikrovaskulären Fragmente verwendet. Die Gefäßfragmente wurden gleichermaßen in zwei Gruppen aufgeteilt und für 24 Stunden

in IGF-1-supplementierter UW-Lösung inkubiert. Die mikrovaskulären Fragmente wurden entweder nach einer 7-tägigen Kryokonservierung oder direkt nach der Inkubation (Kontrolle) auf Scaffolds aufgebracht. Anschließend erfolgte die Implantation der prävascularisierten Scaffolds in die Rückenhautkammer von insgesamt 16 C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (n = 8 pro Gruppe).



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der in vivo Versuchsgruppen und Behandlungsverfahren des zweiten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit im zeitlichen Verlauf von links nach rechts.

### 5.8.3 Versuchsablauf

Zu Beginn der Versuche erfolgte die Kammerpräparation bei den Versuchstieren. Der Eingriff wurde unter Narkose durchgeführt und die präparierten Rückenhautkammern stereomikroskopisch überprüft. Anschließend konnten sich die Tiere in einer 48-stündigen Ruhephase von Anästhesie und operativem Trauma erholen. Daraufhin fand die Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern und die erste Intravitalmikroskopie statt (Tag 0). Die intravitalmikroskopische Untersuchung wurde repetitiv an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation durchgeführt. Vor jeder Intravitalmikroskopie wurde die Rückenhautkammer in 25- und 40-facher Vergrößerung stereomikroskopisch untersucht, um Entzündungen des Gewebes

auszuschließen. Nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchungsreihe an Tag 14 wurden die Tiere durch eine Überdosis des Anästhetikums und anschließender zervikaler Dislokation euthanasiert. Das Rückenhautkammerngewebe wurde einschließlich der Implantate exzidiert und stand für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung.

## 5.9 Statistik

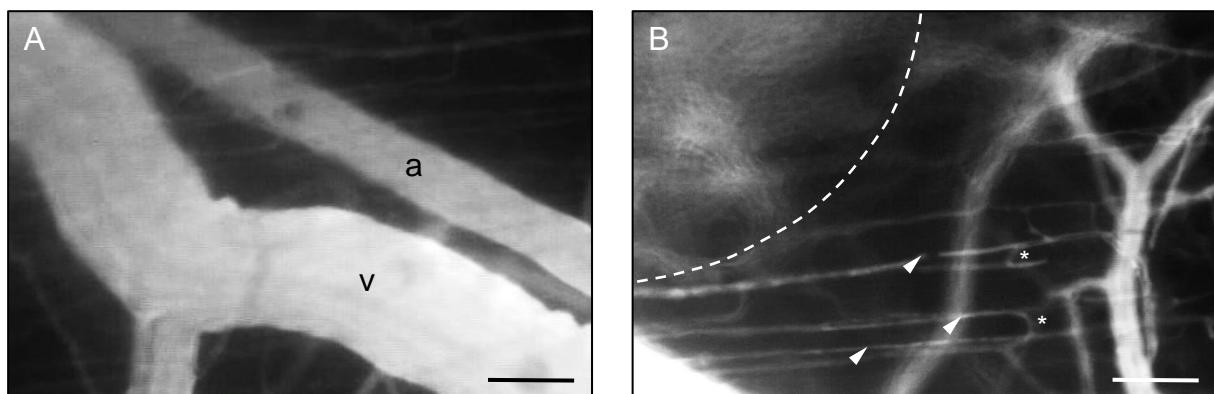
Sämtliche erhobenen Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzgleichheit überprüft. Im Falle einer Normalverteilung der Werte konnten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit mittels one-way analysis of variance (ANOVA) gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test zur Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni auf statistische Signifikanz überprüft werden. Bei Ausschluss einer Normalverteilung wurden die Daten mittels ANOVA gefolgt von einem Dunn's Test analysiert. Im zweiten Studienabschnitt wurden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei Normalverteilung der Daten mittels eines ungepaarten Student's t-Tests und bei Nicht-Normalverteilung mittels eines Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) angegeben. Dabei errechneten sich die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelmesswerten eines Tieres zu einem Versuchszeitpunkt. Aus den Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere innerhalb einer Gruppe wurde ein Gesamtmittelwert  $\pm \text{SEM}$  erhoben. Dieser ist in den Ergebnissen dargestellt und wurde für die statistischen Berechnungen verwendet. Die Datenanalysen und zugehörigen Grafiken wurden mit dem Softwarepaket SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) erstellt. Eine statistische Signifikanz wurde für Werte mit  $p < 0,05$  definiert und entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

In den beiden Studienabschnitten der vorliegenden Arbeit wurde anhand des Modells der Rückenhautkammer der Einfluss einer IGF-1-Stimulation bzw. einer zusätzlichen Kryokonservierung auf die Vaskularisierungskapazität mikrovaskulärer Gefäßfragmente *in vivo* analysiert. Über einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen wurde die Mikrozirkulation des Rückenhautkammerngewebes einschließlich der prävascularisierten Implantate mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Plasma-Marker FITC-Dextran 150 kDa (5 %) diente hierbei zur Darstellung der Blutgefäße, da er aufgrund seines großen Molekulargewichts unter physiologischen Bedingungen eine geringe Extravasation aufweist.



**Abbildung 17:** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; Kontrastverstärkung mittels intravenöser Injektion von 0,1 ml 5 % FITC-Dextran 150 kDa) verschiedener Gefäßabschnitte innerhalb der Rückenhautkammer einer C57BL/6 Maus direkt nach Implantation eines Scaffolds. **A:** Identifizierung einer Arteriole (a) und einer Venole (v) anhand der unterschiedlichen Gefäßdurchmesser und Fließrichtungen. **B:** Darstellung des typisch parallelen Verlaufs der Muskelkapillaren (Pfeilspitzen) und ihrer Querverbindungen (Sterne) innerhalb des Rückenhautgewebes. Markierung des Rands des implantierten Scaffolds durch gestrichelte Linie. Maßstab: A, B = 110 µm.

Das Blutgefäßsystem des Kammergewebes lässt sich in verschiedene Gefäßabschnitte gliedern, die sich in Morphologie und Hämodynamik unterscheiden (Abbildung 17). Arteriolen ( $d = 40 - 60 \mu\text{m}$ ) weisen einen geradlinigen Verlauf, eine glatte Wandstruktur und eine hohe Fließgeschwindigkeit auf. Sie verzweigen sich im Verlauf ein- bis zweimal in kleinere Arteriolen ( $d = 20 - 40 \mu\text{m}$ ) und transportieren

oxygeniertes Blut ins Kapillarbett. Hier findet der Großteil des Gas- und Stoffaustausches statt. Die Kapillaren verlaufen mit einem Abstand von 40 – 60 µm parallel zueinander und weisen gelegentliche Quervernetzungen auf (*Abbildung 17B*). Sie münden in postkapillare Venolen ( $d = 20 - 40 \mu\text{m}$ ), die wiederum in Sammelvenolen ( $d = 40 - 120 \mu\text{m}$ ) drainieren. Aufgrund der Richtung des Blutflusses, der unregelmäßigen Wandstruktur und der geringeren Fließgeschwindigkeit des Blutes sind die Venolen unter intravitalmikroskopischer Sicht leicht von den Arteriolen zu unterscheiden (*Abbildung 17A*).

## 6.2 IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente

### 6.2.1 *In vitro* Analysen

#### 6.2.1.1 Zelluläre Zusammensetzung

Direkt nach der 24-stündigen Kultivierung der mikrovaskulären Fragmente in Vehikel-, IGF-1- oder IGF-1 + IGFbp4-supplementiertem Medium wurde durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Zellmarker bestimmt. Die Analysen ergaben, dass die unterschiedliche Stimulation der Gefäßfragmente keine signifikanten Auswirkungen auf ihre zelluläre Zusammensetzung hat (*Tabelle 3*). In allen drei Gruppen wurden 26 – 30 % CD31<sup>+</sup> Endothelzellen und 10 – 14 %  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Perizyten detektiert. Darüber hinaus wiesen 16 – 25 % der Zellen aller Untersuchungsgruppen die Stroma- bzw. Stammzelloberflächenmarker CD73 oder CD117 auf.

	CD31	$\alpha$ -SMA	CD73	CD117
Vehikel	25,6 ± 2,6	9,8 ± 1,5	16,3 ± 1,7	20,4 ± 1,4
IGF-1	30,2 ± 2,0	13,2 ± 3,2	20,1 ± 0,5	25,0 ± 1,8
IGF-1 + IGFbp4	30,0 ± 1,0	13,6 ± 1,7	21,6 ± 0,6	22,8 ± 2,4

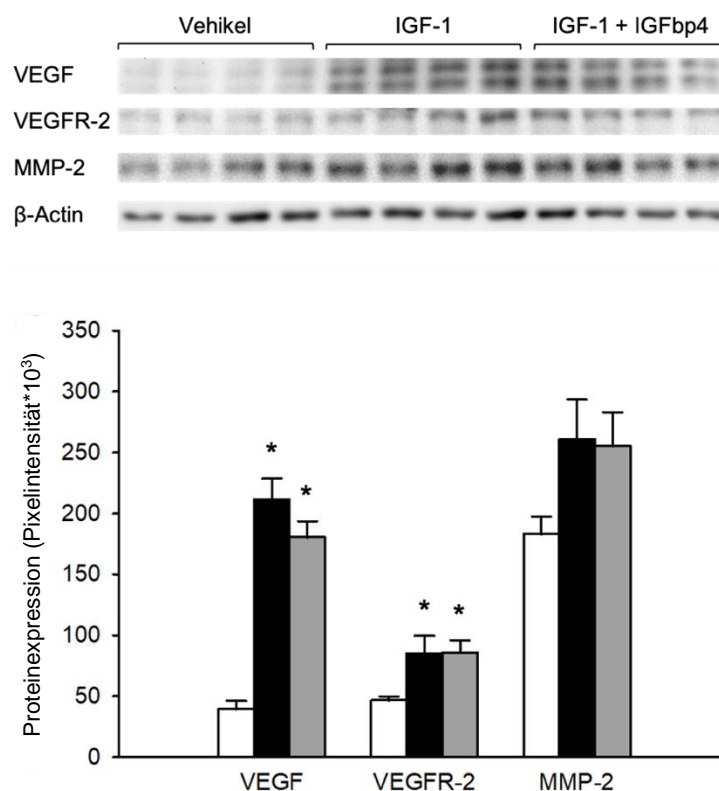
**Tabelle 3:** Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker (% aller Zellen) auf Zellen mikrovaskulärer Fragmente unmittelbar nach 24-stündiger Kultivierung in Vehikel- ( $n = 3$ ), IGF-1- ( $n = 3$ ) oder IGF-1 + IGFbp4- ( $n = 3$ ) supplementierter 4 °C UW-Lösung. Mittelwert ± SEM.



### 6.2.1.2 Pro-angiogene Aktivität

Um die pro-angiogene Aktivität der mikrovaskulären Fragmente im Anschluss an die 24-stündige Stimulation mit Vehikel-, IGF-1- oder IGF-1 + IGFbp4-supplementierter UW-Lösung analysieren zu können, wurde ein Western Blot durchgeführt. Bestimmt wurde hierbei die Expression von VEGF, VEGFR-2 sowie MMP-2.

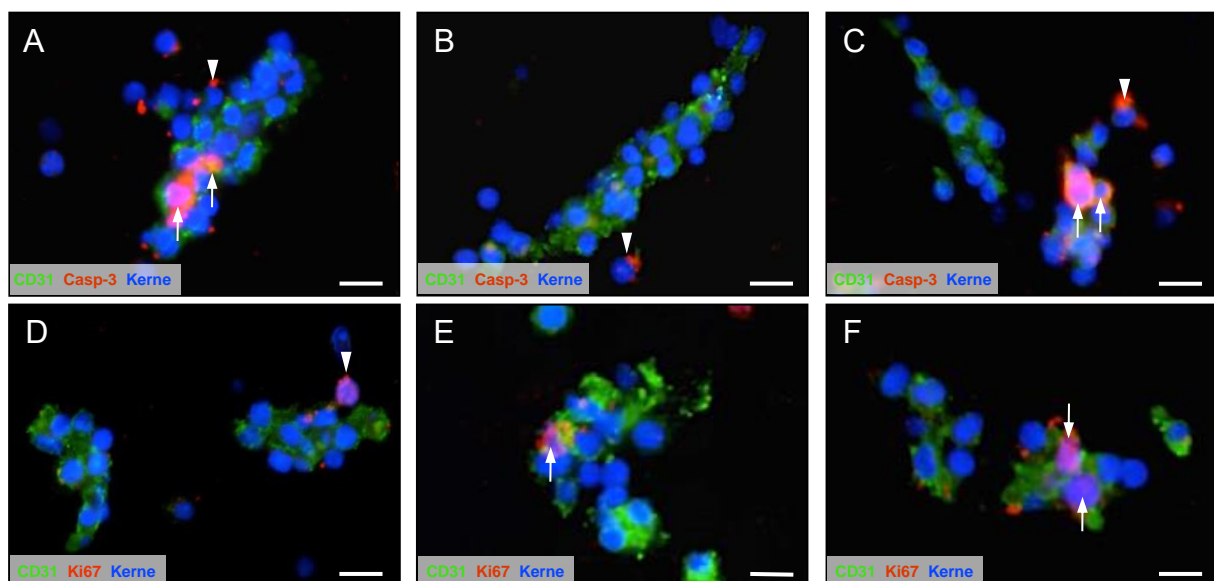
Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gefäßfragmente eine verschieden hohe Expression der pro-angiogenen Faktoren aufweisen. Die VEGF- sowie VEGFR-2-Expression war bei IGF-1- und IGF-1 + IGFbp4-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten signifikant höher als in der Vehikel-Gruppe (*Abbildung 18*). Zudem wurde auch MMP-2 von IGF-1- und IGF-1 + IGFbp4-stimulierten Gefäßfragmenten stärker exprimiert. Eine statistische Signifikanz lag hier jedoch nicht vor.



**Abbildung 18:** VEGF-, VEGFR-2- und MMP-2-Expression (Pixelintensität  $\cdot 10^3$ ) der mikrovaskulären Fragmente unmittelbar nach 24-stündiger Kultivierung in Vehikel- (weiße Balken;  $n = 4$ ), IGF-1- (schwarze Balken;  $n = 4$ ) oder IGF-1 + IGFbp4- (graue Balken;  $n = 4$ ) supplementierter 4 °C UW-Lösung. Korrektur der Daten über internen  $\beta$ -Actin-Standard. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Vehikel.

### 6.2.1.3 Viabilität und Proliferation

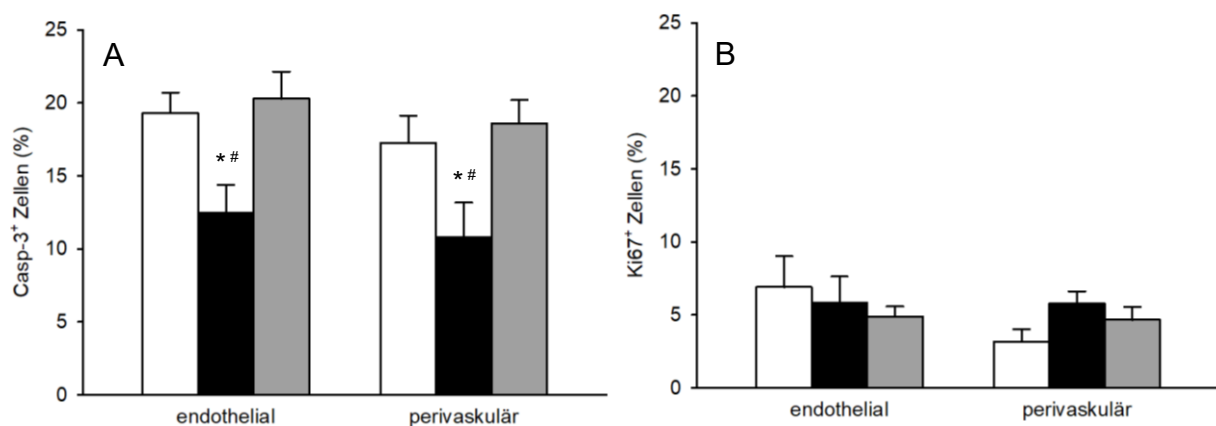
Mittels Immunhistochemie wurde die Viabilität und Proliferation mikrovaskulärer Fragmente direkt nach der Kultivierungsphase untersucht. Zu diesem Zweck wurde nach Stimulation der mikrovaskulären Fragmente in Vehikel-, IGF-1- oder IGF-1 + IGFbp4-supplementiertem Medium eine CD31-Casp-3- und eine CD31-Ki67-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. Unter fluoreszenzmikroskopischer Sicht war der charakteristische Aufbau der mikrovaskulären Fragmente aus CD31<sup>+</sup> Endothelzellen erkennbar, welche von außen durch angelagerte CD31<sup>-</sup> Perizyten stabilisiert werden (*Abbildung 19A – F*). Neben ihren stützenden und kontraktile Eigenschaften sind diese perivaskulären Zellen an diversen Prozessen, wie der Angiogenese und Synthese vasoaktiver Substanzen, beteiligt [BIRBRAIR, 2018].



**Abbildung 19: A – F:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Fibrin-eingebetteter mikrovaskulärer Fragmente unmittelbar nach 24-stündiger Kultivierung in Vehikel- (A, D), IGF-1- (B, E) oder IGF-1 + IGFbp4- (C, F) supplementierter 4 °C UW-Lösung. Visualisierung der Endothelzellen durch Anfärbung mit einem CD31-Antikörper (A – F; grün) und der Zellkerne mittels Hoechst 33342 (A – F; blau). Zusätzlich wurde ein Casp-3-Antikörper zur Detektion von apoptotischen Zellen (A – C; rot) und ein Ki67-Antikörper zur Markierung von proliferierenden Zellen (D – F; rot) eingesetzt. Pfeile = Casp-3<sup>+</sup> (A – C) bzw. Ki67<sup>+</sup> (D – F) Endothelzellen, Pfeilspitzen = Casp-3<sup>+</sup> (A – C) bzw. Ki67<sup>+</sup> (D – F) perivaskuläre Zellen. Maßstab: 10 µm.

In der Gruppe der IGF-1-stimulierten Gefäßfragmente waren etwa 12 % der Endothelzellen und 11 % der perivaskulären Zellen positiv für den Apoptosemarker Casp-3. Dies lag signifikant unter dem Anteil apoptotischer Zellen in den

Vergleichsgruppen mit Vehikel- oder IGF-1 + IGFbp4-behandelten Fragmenten. Hier lag der durchschnittliche Anteil apoptotischer endothelialer Zellen innerhalb der mikrovaskulären Fragmente bei 19 % und der Anteil apoptotischer perivaskulärer Zellen bei 17 % (*Abbildung 20A*). Zusätzlich wurden in allen drei Versuchsgruppen ohne statistisch signifikante Unterschiede 5 – 7 % Ki67<sup>+</sup> Endothelzellen und 3 – 6 % Ki67<sup>+</sup> perivaskuläre Zellen gefunden (*Abbildung 20B*). Dies zeigt, dass die verschiedenen Supplemente keinen Einfluss auf die proliferative Aktivität der Gefäßfragmente hatten.



**Abbildung 20:** A, B: Casp-3<sup>+</sup> (A; %) und Ki67<sup>+</sup> (B; %) endotheliale und perivaskuläre Zellen innerhalb von mikrovaskulären Fragmenten unmittelbar nach 24-stündiger Kultivierung in Vehikel- (weiße Balken; n = 4), IGF-1- (schwarze Balken, n = 4) oder IGF-1 + IGFbp4- (graue Balken; n = 4) supplementierter 4 °C UW-Lösung. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Vehikel; #p < 0,05 vs. IGF-1 + IGFbp4.

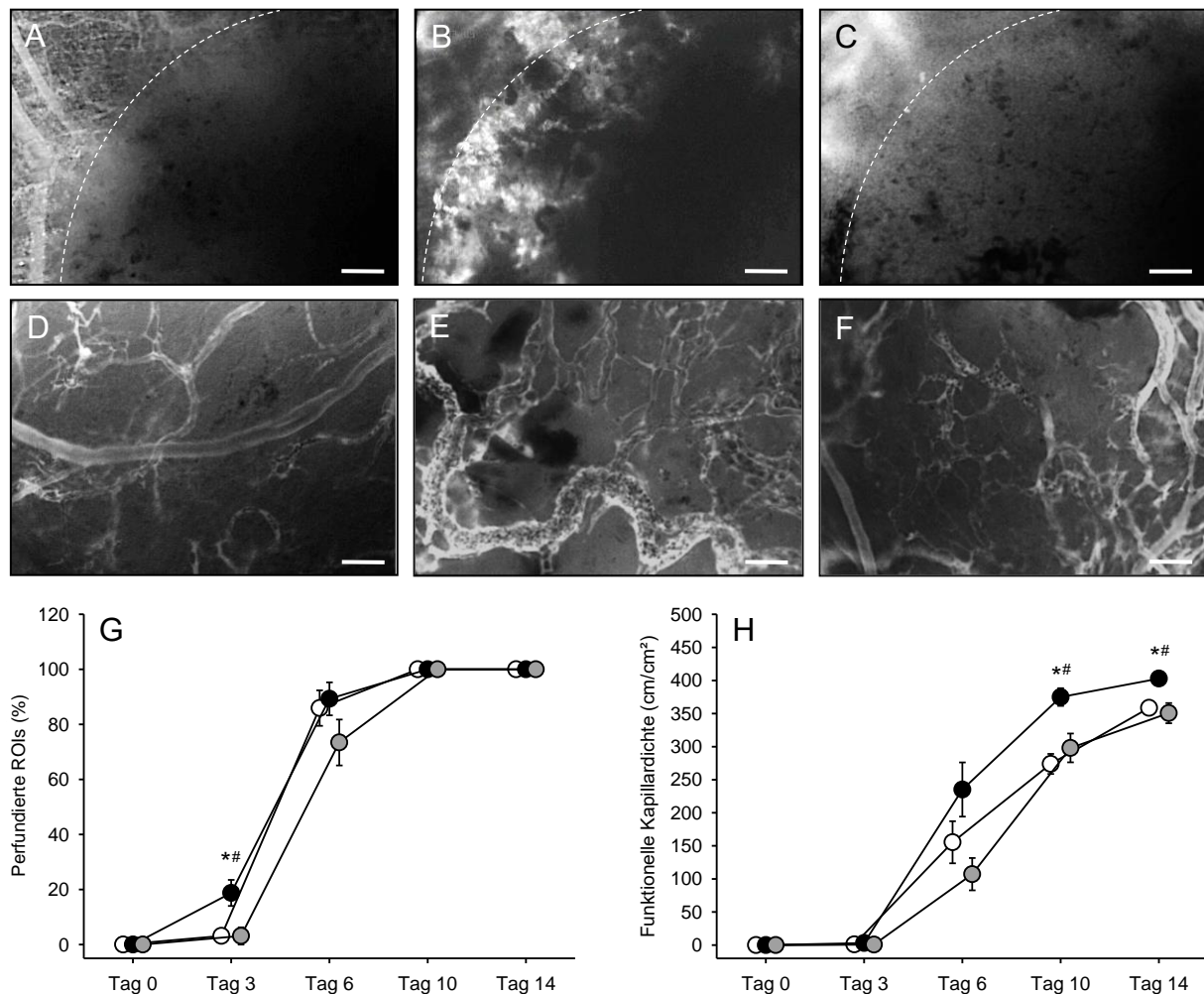
## 6.2.2 In vivo Analysen

### 6.2.2.1 Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die fortschreitende Vaskularisierung von prävaskularisierten Scaffolds nach Implantation in C57BL/6 Wildtyp-Mäuse untersucht werden. Da die mikrovaskulären Fragmente aus transgenen GFP<sup>+</sup> Spendermäusen isoliert wurden, war es möglich, die GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente auch nach ihrem Transfer auf die Scaffolds und Implantation in GFP<sup>-</sup> Empfängermaäuse zu detektieren.

Bereits am dritten Tag nach Implantation wurden perfundierte Gefäßknospen und -sprossen im Randbereich der Scaffolds nachgewiesen. Diese ersten Zeichen einer Vaskularisierung waren bei deutlich mehr Scaffolds erkennbar, die mit IGF-1-

stimulierten Gefäßfragmenten besiedelt worden waren. Bei Scaffolds mit Vehikel- oder IGF-1 + IGFBp4-stimulierten Gefäßfragmenten zeigten sich an diesem Analysetag nahezu keine perfundierten ROIs (*Abbildung 21A – C, G*).



**Abbildung 21:** A – F: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (in Blaulicht-Epi-Illumination; Kontrastverstärkung mittels intravenöser Injektion von 0,1 ml 5 % FITC-Dextran 150 kDa) von prävascularisierten Scaffolds (Rand markiert durch gestrichelte Linie in A – C) an Tag 3 (A – C) und Tag 14 (D – F) nach Implantation in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (A, D), IGF-1- (B, E) oder IGF-1 + IGFBp4- (C, F) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Maßstab: A – C = 170 µm; D – F = 70 µm. G, H: Perfundierte ROIs (G; %) und funktionelle Kapillardichte (H; cm/cm²) prävascularisierter Scaffolds direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10., und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (weiße Kreise; n = 8), 1 µM IGF-1- (schwarze Kreise; n = 8) und 1 µM IGF-1 + 0,5 µg/ml IGFBp4- (graue Kreise; n = 8) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Vehikel; #p < 0,05 vs. IGF-1 + IGFBp4.

Im Verlauf des 14-tägigen Versuchszeitraums bildeten einwachsende Gefäße aus dem umliegenden Empfängergewebe und die Gefäßfragmente über Inoskulation ein perfundiertes mikrovaskuläres Netzwerk innerhalb der Scaffold-Poren. Dabei waren Scaffolds mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten wesentlich

dichter vaskularisiert als Scaffolds der beiden Vergleichsgruppen. An Tag 10 lag die funktionelle Kapillardichte der IGF-1 Gruppe bei  $\sim 375 \text{ cm/cm}^2$ , an Tag 14 bei  $> 400 \text{ cm/cm}^2$ , während in der Gruppe der Vehikel-stimulierten Gefäßfragmente die funktionelle Kapillardichte an Tag 10 nur  $\sim 275 \text{ cm/cm}^2$  und an Tag 14  $\sim 360 \text{ cm/cm}^2$  erreichte (*Abbildung 21D, E, H*). Die funktionelle Kapillardichte von Scaffolds mit IGF-1 + IGFbp4-stimulierten Gefäßfragmenten war vergleichbar mit derjenigen der Vehikel-Gruppe. In allen Implantaten lag der Anteil der perfundierten ROIs an Tag 10 bei 100 % (*Abbildung 21G*).

#### 6.2.2.2 Mikrohämodynamik

An jedem Untersuchungstag des zweiwöchigen Versuchszeitraums wurden von randomisiert ausgewählten Gefäßen innerhalb der Scaffolds die Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Scherrate bestimmt (*Tabelle 4*).

Dabei zeigte sich eine verbesserte Mikrohämodynamik in der Gruppe der Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt worden waren. Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser reduzierte sich in dieser Gruppe von  $\sim 32 \text{ }\mu\text{m}$  an Tag 3 auf  $\sim 10 \text{ }\mu\text{m}$  an Tag 14 und lag somit signifikant unterhalb des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers von Scaffolds mit Vehikel- oder IGF-1 + IGFbp4-behandelten mikrovaskulären Fragmenten. In der Gruppe IGF-1-stimulierter Gefäßfragmente wurden an Tag 10 und Tag 14 zudem schnellere Blutzellgeschwindigkeiten gemessen, die im Durchschnitt  $100 \text{ }\mu\text{m/s}$  über den Werten der Vergleichsgruppen lagen. Die beschriebene Verringerung des Gefäßdurchmessers bei steigender Blutzellgeschwindigkeit ist ein Charakteristikum des Reifungsprozesses von Blutgefäßen [LASCHKE et al., 2014]. Aus der Reduktion der Gefäßdurchmesser und dem schnellen Anstieg der Blutzellgeschwindigkeiten in der Gruppe der IGF-1-stimulierten Gefäßfragmente resultierten auch signifikant höhere Scherraten am 10. und 14. Tag nach Implantation. Die Scherrate war mit  $\sim 400 \text{ s}^{-1}$  an Tag 14 mehr als 1,5-fach so hoch wie in den Vergleichsgruppen mit  $\sim 260 \text{ s}^{-1}$ .

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<i>Durchmesser (<math>\mu\text{m}</math>)</i>				
Vehikel	55,5 $\pm$ 9,8	21,2 $\pm$ 0,8	15,7 $\pm$ 0,8	12,9 $\pm$ 0,5
IGF-1	32,1 $\pm$ 6,7	21,8 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 0,5 <sup>*#</sup>	10,4 $\pm$ 0,4 <sup>*#</sup>
IGF-1 + IGFbp4	39,6 $\pm$ 4,7	24,1 $\pm$ 1,8	15,0 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 0,7
<i>Blutzellgeschwindigkeit (<math>\mu\text{m/s}</math>)</i>				
Vehikel	25,0 $\pm$ 3,0	194,4 $\pm$ 28,1 <sup>#</sup>	284,9 $\pm$ 33,5	360,1 $\pm$ 21,9
IGF-1	39,5 $\pm$ 9,8	185,1 $\pm$ 28,9 <sup>#</sup>	385,2 $\pm$ 30,3 <sup>*#</sup>	451,3 $\pm$ 13,2 <sup>*#</sup>
IGF-1 + IGFbp4	13,6 $\pm$ 11,1	96,7 $\pm$ 16,6	243,0 $\pm$ 34,7	341,1 $\pm$ 23,4
<i>Scherrate (<math>\text{s}^{-1}</math>)</i>				
Vehikel	5,0 $\pm$ 2,3	86,7 $\pm$ 12,3 <sup>#</sup>	178,8 $\pm$ 23,9	259,0 $\pm$ 17,0
IGF-1	26,6 $\pm$ 14,4	77,7 $\pm$ 13,4 <sup>#</sup>	276,9 $\pm$ 17,4 <sup>*#</sup>	402,8 $\pm$ 21,2 <sup>*#</sup>
IGF-1 + IGFbp4	2,9 $\pm$ 2,4	39,0 $\pm$ 7,7	165,1 $\pm$ 30,0	255,1 $\pm$ 24,5

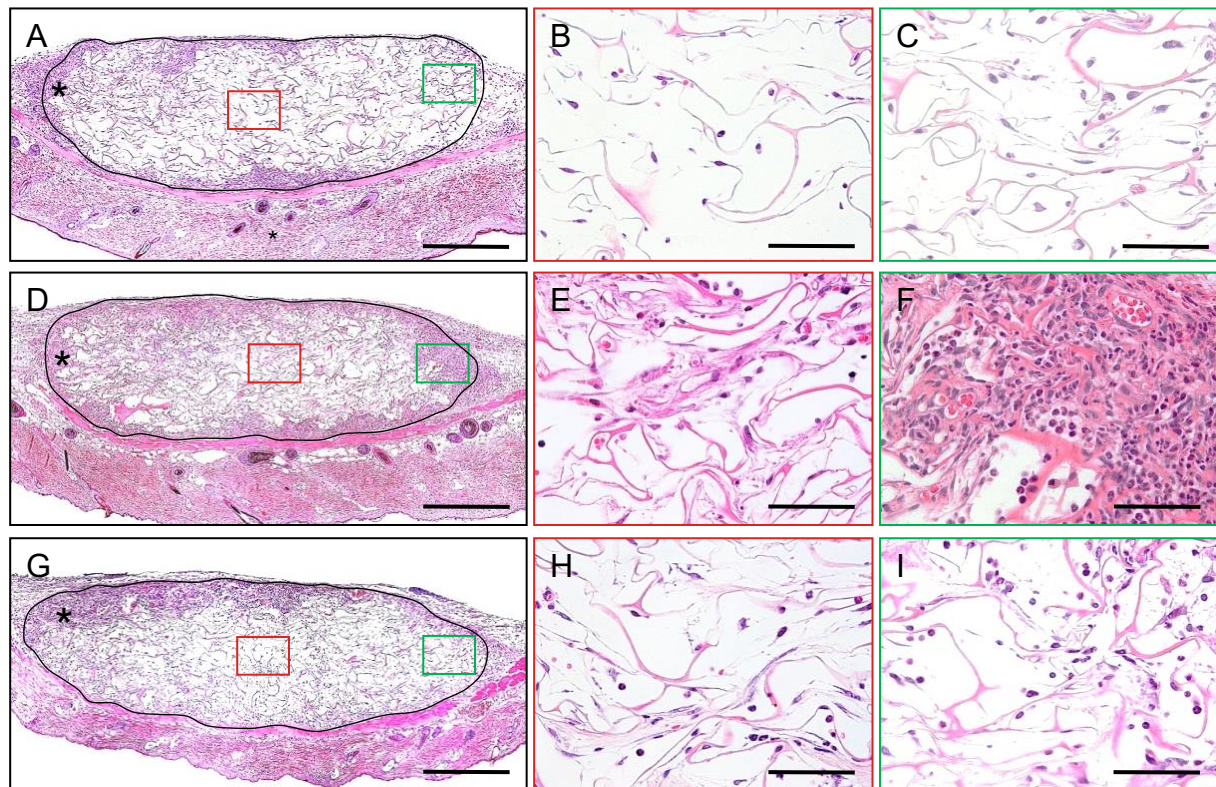
**Tabelle 4.** Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) randomisiert ausgewählter Gefäße prävascularisierter Scaffolds am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- ( $n = 8$ ), IGF-1- ( $n = 8$ ) oder IGF-1 + IGFbp4- ( $n = 8$ ) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Vehikel; # $p < 0,05$  vs. IGF-1 + IGFbp4.

### 6.2.2.3 Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds

14 Tage nach Implantation wurden die Scaffolds mitsamt des umliegenden Rückenhautkammerngewebes exzidiert und für histologische und immunhistochemische Analysen asserviert.

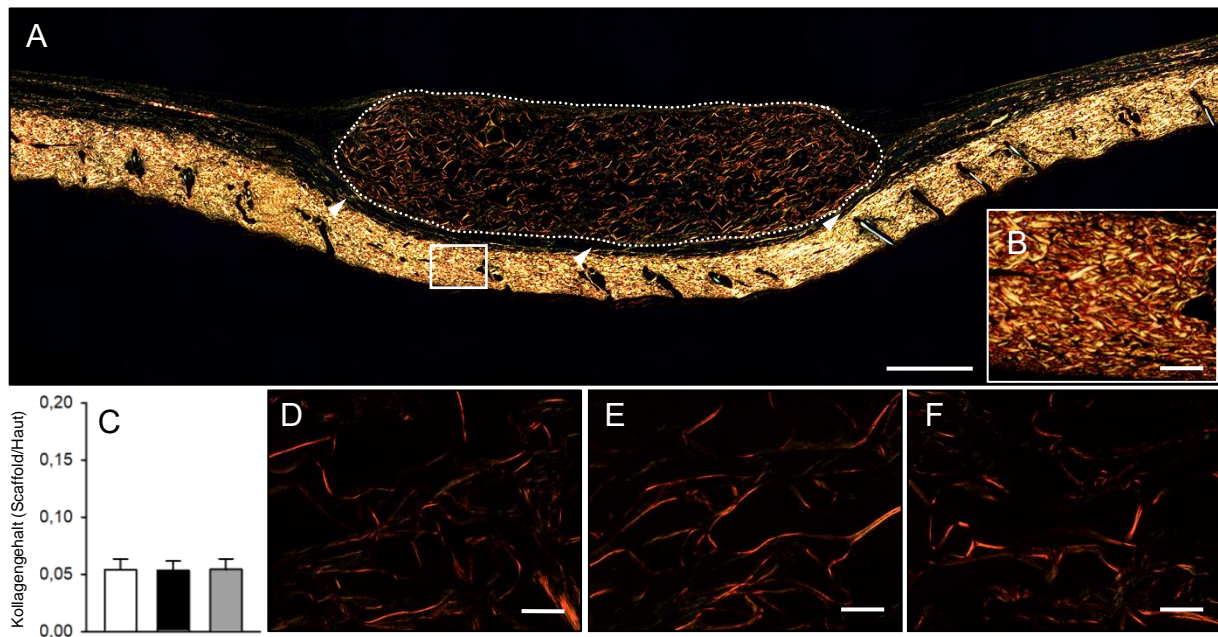
Die HE-Übersichtsfärbung zeigte, dass die Scaffolds und das umliegende Empfängergewebe aller Gruppen von dichtem, vaskularisiertem Granulationsgewebe durchwachsen waren, welches bis ins Zentrum reichte. Dabei war ein wesentlich dichteres Granulationsgewebe im Randbereich zum Kammergewebe und in zentralen Arealen der Scaffolds zu erkennen, die mit IGF-1-inkubierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt worden waren (Abbildung 22A – I).





**Abbildung 22:** **A, D, G:** HE-gefärbte Schnitte von prävascularisierten Scaffolds (Rand markiert durch schwarze Linie in A, D, G) und angrenzendem Rückenhautkammerngewebe am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (A – C), IGF-1- (D – F) oder IGF-1 + IGFBP4- (G – I) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Innerhalb der Implantate sowie im umliegenden Randbereich ist neugebildetes Granulationsgewebe erkennbar (Sterne). **B, E, H:** Zentrale Areale der Scaffolds markiert durch rote Rahmen in A, D, G; **C, F, I:** Periphere Areale der Scaffolds markiert durch grüne Rahmen in A, D, G. Maßstab: A, D, G = 380 µm; B, C, E, F, H, I = 60 µm.

Kollagene Fasern innerhalb der Scaffolds wurden mit Hilfe einer Sirius Red-Färbung visualisiert (*Abbildung 23A und B*). Dabei waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des Kollagengehalts festzustellen (*Abbildung 23C – F*). Dies bedeutet, dass das neugebildete Granulationsgewebe aller drei Gruppen von einem vergleichbar dichten kollagenen Netzwerk durchzogen war. Innerhalb dieses kollagenen Netzwerks konnte jedoch in Scaffolds mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten ein stärkerer Einwuchs von Blutgefäßen aus dem umliegenden Gewebe nachgewiesen werden.

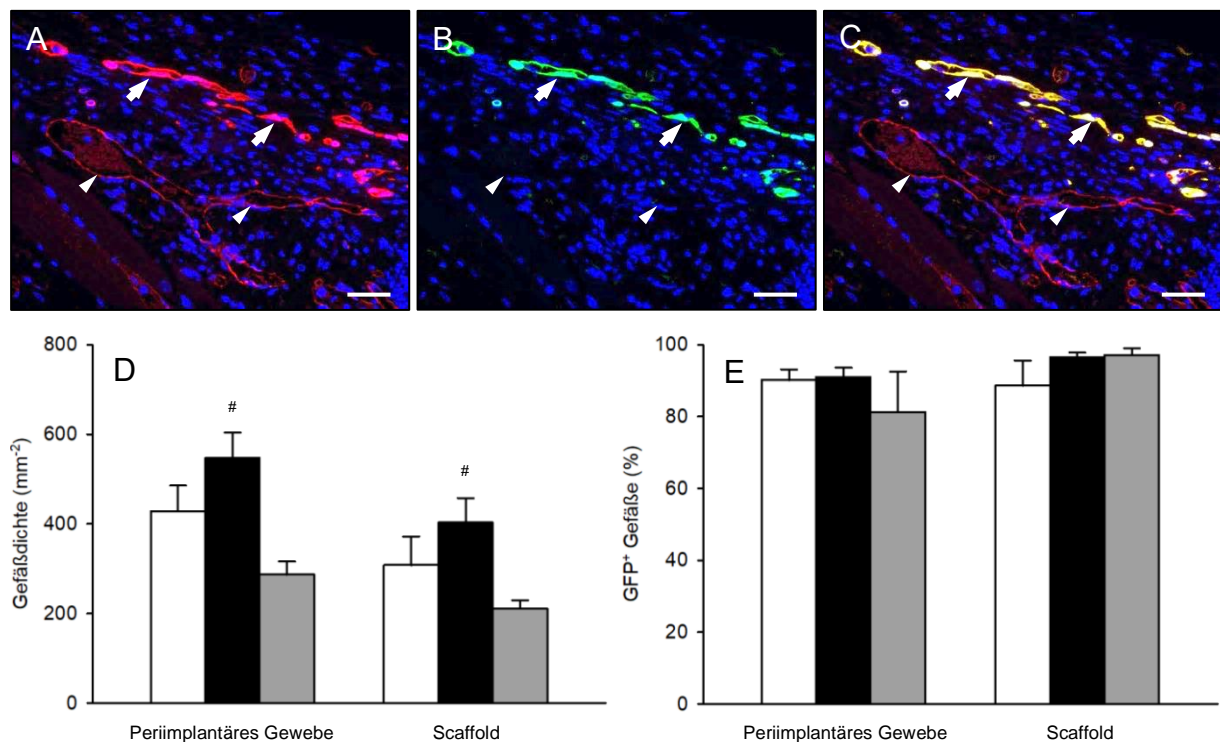


**Abbildung 23:** Sirius Red-gefärbte Schnitte von prävascularisierten Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. **A:** Übersichtsaufnahme eines Implantats (Rand markiert durch punktierte Linie) auf der quergestreiften Muskulatur (Pfeilspitzen) der Rückenhautkammer. Das Scaffold wurde mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. **B:** Aufnahme von Kollagenfasern der Haut. Bildausschnitt markiert durch einen weißen Rahmen in A. **C:** Kollagengehalt (Scaffold/Haut) von prävascularisierten Scaffolds am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (weißer Balken;  $n = 8$ ), 1  $\mu$ M IGF-1- (schwarzer Balken;  $n = 8$ ) oder 1  $\mu$ M IGF-1 + 0,5  $\mu$ g/ml IGFBP4- (grauer Balken;  $n = 8$ ) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Mittelwert  $\pm$  SEM. **D – F:** Aufnahmen zentraler Areale von prävascularisierten Scaffolds. Die Gefäßfragmente wurden für 24 h in Vehikel- (D), IGF-1- (E) oder IGF-1 + IGFBP4- (F) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Maßstab: A = 550  $\mu$ m; B = 60  $\mu$ m; D – F = 40  $\mu$ m.

Des Weiteren zeigten auch immunhistochemische Analysen eine höhere Gefäßdichte innerhalb der Scaffolds sowie im umliegenden Rückenhautkammerngewebe der IGF-1 Gruppe (Abbildung 24A – D). Der Anteil an GFP<sup>+</sup>-Endothelzellen innerhalb der Scaffolds sowie im periimplantären Gewebe aller drei Gruppen lag bei über 80 % (Abbildung 24E).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die mikrovaskulären Fragmente aller drei Gruppen die 24-stündige Kultivierungsperiode und Implantation gut tolerierten und alle Scaffolds vergleichsweise gut in das umliegende Kammergewebe inkorporiert wurden. IGF-1-stimulierte Gefäßfragmente wiesen dabei ein besseres Vaskularisierungspotential auf als die Gefäßfragmente der Vergleichsgruppen, was an einer früher einsetzenden Vaskularisierung und einer höheren Gefäßdichte innerhalb der Scaffolds und im umliegenden Kammergewebe erkennbar war (Abbildung 24D).





**Abbildung 24:** A – C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Gefäßsystems in zentralen Arealen eines prävasikularisierten Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenmarkkammer einer C57BL/6 Maus. Das Scaffold wurde mit IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten besiedelt. Die Färbung der Schnitte erfolgte mittels Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (A – C; blau), eines Antikörpers gegen CD31 zur Detektion der Endothelzellen (A; rot) und eines Antikörpers gegen GFP (B; grün). C: Überlagerung von A und B. Pfeile = GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße und Pfeilspitzen = GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße. Maßstab: A – C = 50 µm. D, E: Gefäßdichte (D; mm<sup>-2</sup>) und GFP<sup>+</sup> Gefäße (E; %) innerhalb von prävasikularisierten Scaffolds sowie im angrenzenden Rückenmarkkammergewebe am 14. Tag nach Implantation der Scaffolds in die Rückenmarkkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (weiße Balken; n = 8), IGF-1- (schwarze Balken; n = 8) oder IGF-1 + IGFbp4- (graue Balken; n = 8) supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Mittelwert ± SEM. #p < 0,05 vs. IGF-1 + IGFbp4.

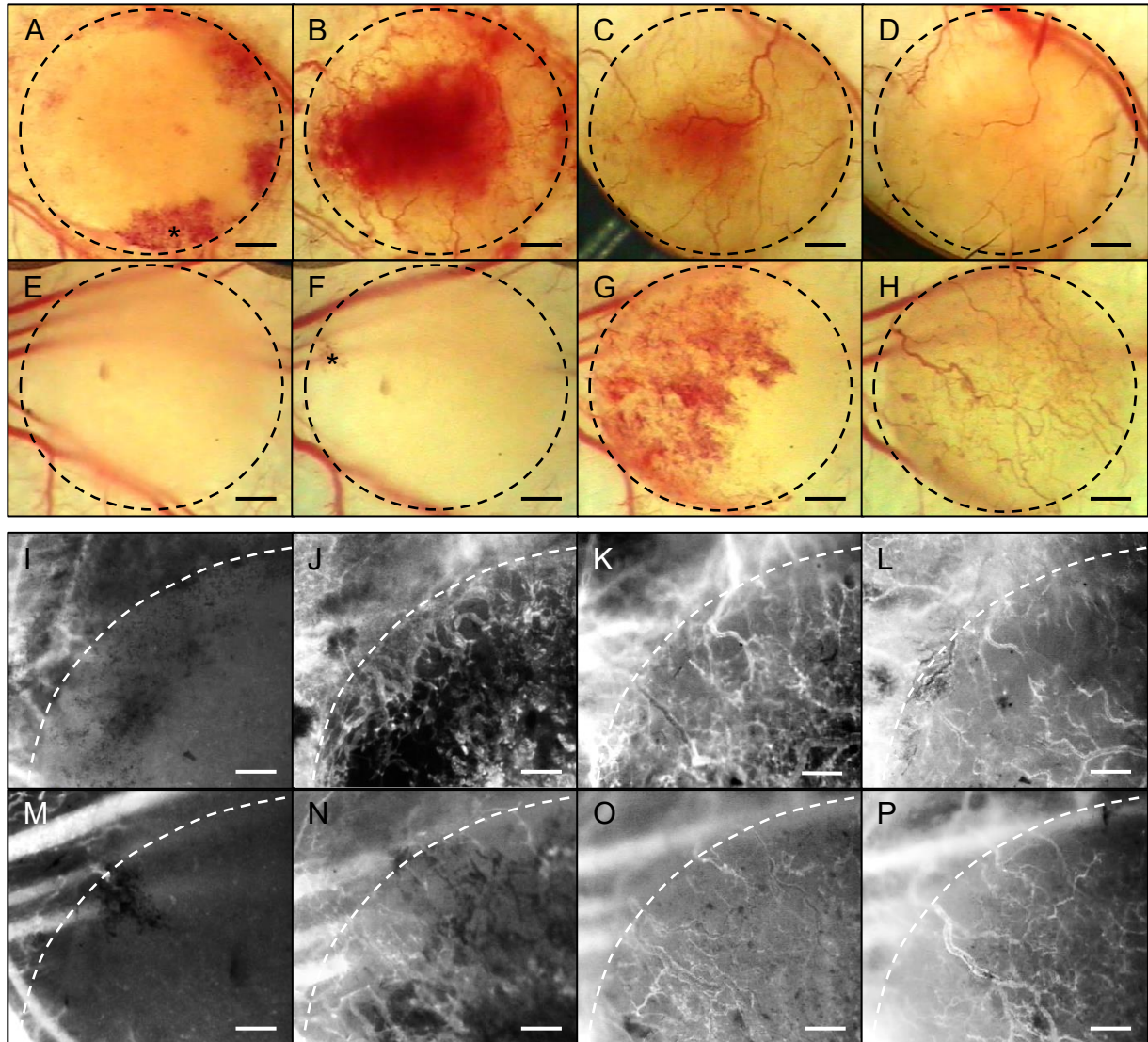
## 6.3 Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

### 6.3.1 In vivo Analysen

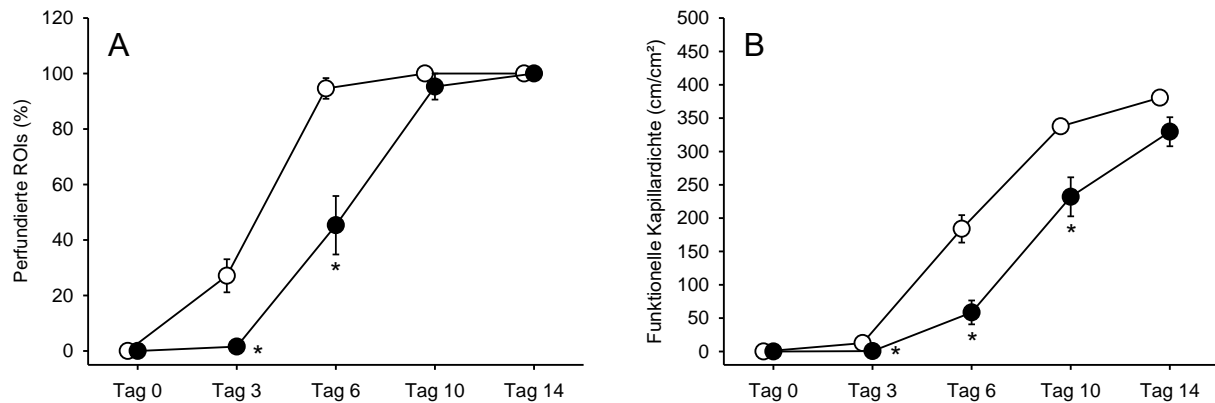
#### 6.3.1.1 Vaskularisierung der implantierten Scaffolds

In beiden Versuchsgruppen konnte über den 14-tägigen Versuchszeitraum eine fortschreitende Vaskularisierung der Scaffolds durch die mikrovaskulären Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die Gefäßfragmente sprossen aus und bildeten

über Inoskulation mit den einwachsenden Gefäßen des umliegenden Empfängerorgans ein durchblutetes und dichtes mikrovaskuläres Netzwerk aus.



**Abbildung 25:** Stereomikroskopische (A – H) und intravitalmikroskopische (I – P; in Blaulicht-Epi-Illumination; Kontrastverstärkung mittels intravenöser Injektion von 0,1 ml 5 % FITC-Dextran 150 kDa) Aufnahmen der Vaskularisierung von prävascularisierten Scaffolds (Rand markiert durch gestrichelte Linie) an Tag 3 (A, E, I, M), 6 (B, F, J, N), 10 (C, G, K, O) und 14 (D, H, L, P) nach Implantation in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (A – D, I – L) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (E – H, M – P) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Innerhalb der Implantate sind erste Gefäßeinsprossungen an Tag 3 bzw. Tag 6 im Randbereich erkennbar (Sterne). Maßstab: A – H = 460 µm; I – P = 180 µm.



**Abbildung 26:** Perfundierte ROIs (A; %) und funktionelle Kapillardichte (B; cm/cm<sup>2</sup>) prävascularisierter Scaffolds direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in 1  $\mu$ M IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (Kontrolle; weiße Kreise; n = 8) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (IGF-1 + Kryo; schwarze Kreise; n = 8) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Hierbei zeigten Scaffolds, die mit kryokonservierten Gefäßfragmenten besiedelt worden waren, erst an Tag 6 Gefäßeinsprossungen im Randbereich, während in der Kontrollgruppe bereits an Tag 3 erste Zeichen einer Vaskularisierung erkennbar waren (Abbildung 25A, F). Zudem verlief der Vaskularisierungsprozess in der Gruppe mit kryokonservierten Gefäßfragmenten deutlich langsamer. Erst an Tag 14 waren alle ROIs perfundiert, in der Kontrollgruppe dagegen bereits an Tag 6 (Abbildung 26A). Dementsprechend wies die Kontrollgruppe am 6. Tag nach Implantation mit ~ 180 cm/cm<sup>2</sup> eine mehr als dreifach so hohe Gefäßdichte wie die Kryo-Gruppe mit ~ 60 cm/cm<sup>2</sup> auf. Bis zum Ende des Versuchszeitraums konnte jedoch eine starke Zunahme der Gefäßdichte in der Kryo-Gruppe nachgewiesen werden. Zwar lag diese mit ~ 330 cm/cm<sup>2</sup> an Tag 14 etwas unterhalb der Kontrollgruppe mit ~ 380 cm/cm<sup>2</sup>, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte aber nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26B).

### 6.3.1.2 Mikrohämodynamik

Über den 2-wöchigen Beobachtungszeitraum bildete sich in allen Scaffolds ein dichtes und perfundiertes Gefäßsystem aus. Um die Mikrohämodynamik während dieses Prozesses genauer beurteilen zu können, wurden an jedem Untersuchungstag an randomisiert ausgewählten Gefäßen die Parameter Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Scherrate bestimmt (Tabelle 5).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<i>Durchmesser (<math>\mu\text{m}</math>)</i>				
Kontrolle	27,0 $\pm$ 2,1	20,0 $\pm$ 0,7	13,0 $\pm$ 0,5	11,1 $\pm$ 0,3
IGF-1 + Kryo	-	21,4 $\pm$ 2,3	15,1 $\pm$ 0,6*	11,7 $\pm$ 0,7
<i>Blutzellgeschwindigkeit (<math>\mu\text{m/s}</math>)</i>				
Kontrolle	50,5 $\pm$ 14,0	184,0 $\pm$ 23,1	328,8 $\pm$ 28,9	412,9 $\pm$ 13,5
IGF-1 + Kryo	-	110,8 $\pm$ 14,7*	187,7 $\pm$ 36,2*	291,0 $\pm$ 23,4*
<i>Scherrate (<math>\text{s}^{-1}</math>)</i>				
Kontrolle	16,2 $\pm$ 5,3	88,0 $\pm$ 13,0	223,4 $\pm$ 19,3	337,7 $\pm$ 19,9
IGF-1 + Kryo	-	54,2 $\pm$ 11,3	120,4 $\pm$ 24,4*	225,1 $\pm$ 28,3*

**Tabelle 5.** Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) randomisiert ausgewählter Gefäße prävascularisierter Scaffolds am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24h in 1  $\mu\text{M}$  IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (Kontrolle; n = 8) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (IGF-1 + Kryo; n = 8) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Gefäßdurchmesser von Scaffolds mit kryokonservierten Gefäßfragmenten waren an Tag 10 mit  $\sim 15 \mu\text{m}$  signifikant größer im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe mit  $\sim 13 \mu\text{m}$ . Bis zum 14. Tag nach Implantation reduzierten sich die Gefäßdurchmesser beider Gruppen allerdings auf vergleichbare Werte von  $\sim 11 - 12 \mu\text{m}$ . Eine Reduktion der Gefäßdurchmesser sowie eine Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit sind ein Indikator für die Ausreifung von Gefäßen [LASCHKE et al., 2014]. Dementsprechend stieg die Blutzellgeschwindigkeit innerhalb von Scaffolds, die mit kryokonservierten Gefäßfragmenten besiedelt worden waren, von  $\sim 110 \mu\text{m/s}$  am 6. Tag nach Implantation auf  $\sim 290 \mu\text{m/s}$  am 14. Tag an. In der Kontrollgruppe konnten jedoch signifikant höhere Blutzellgeschwindigkeiten von  $\sim 180 \mu\text{m/s}$  an Tag 6 und  $\sim 410 \mu\text{m/s}$  am letzten Untersuchungstag gemessen werden.

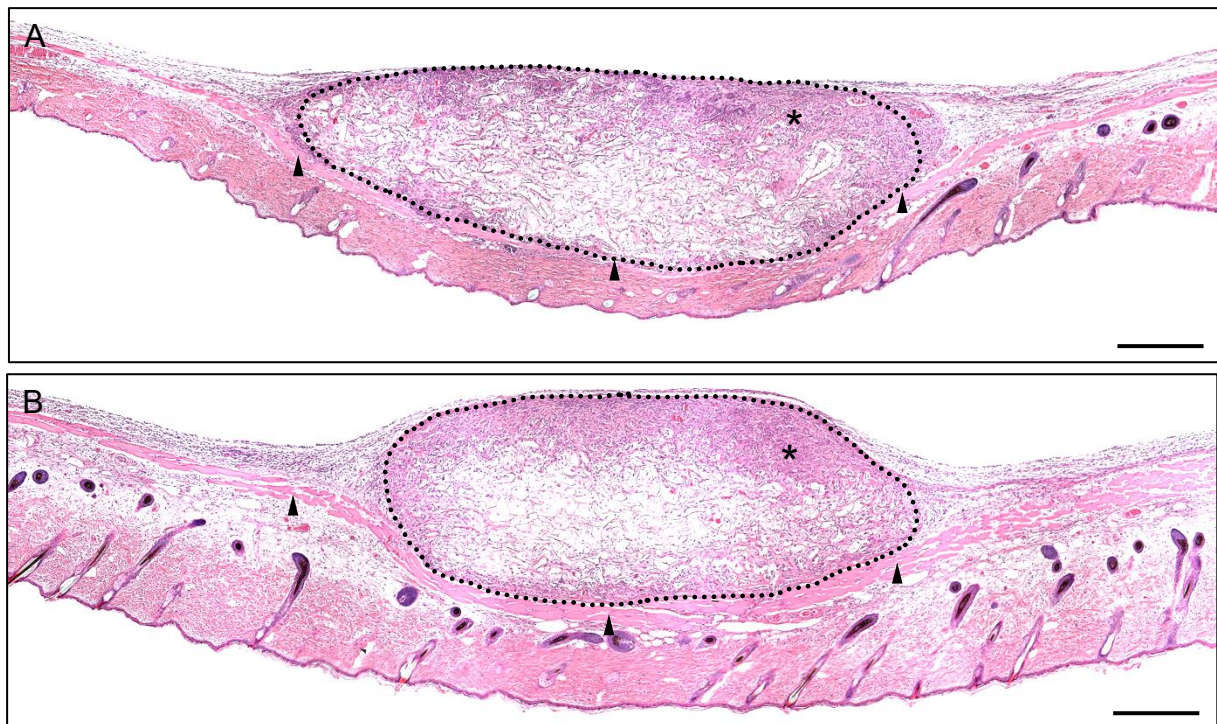
Aus den höheren Gefäßdurchmessern und den geringeren Blutzellgeschwindigkeiten in der Gruppe von Scaffolds, die mit kryokonservierten Gefäßen besiedelt worden waren, resultierten signifikante Unterschiede der Scherraten ab dem 10. Tag nach Implantation. Am 14. Tag nach Implantation lag die Scherrate um  $\sim 110 \text{s}^{-1}$  unterhalb jener der Kontrollgruppe.



### 6.3.1.3 Inkorporation und Gefäßarchitektur der implantierten Scaffolds

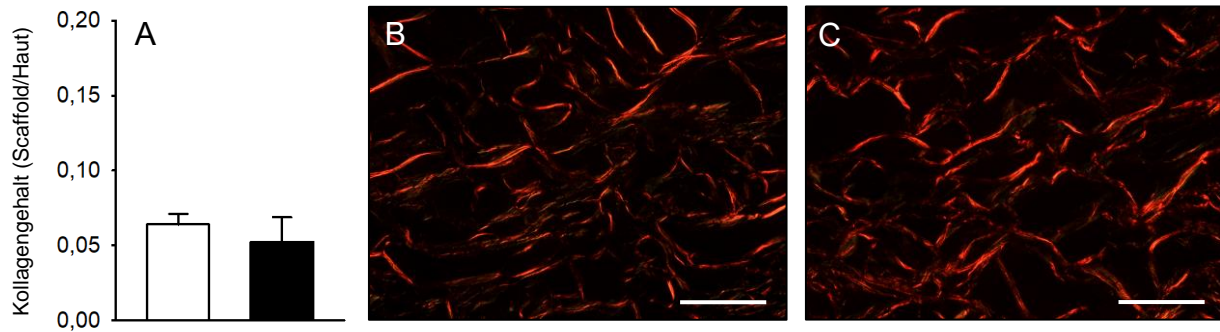
Die Inkorporation der Implantate innerhalb des Empfängergewebes wurde in der vorliegenden Arbeit mittels histologischer Analysen nach dem 14-tägigen Versuchszeitraum näher untersucht.

HE-gefärbte Schnitte der exzidierten Scaffolds zeigten randständig einwachsendes, dichtes Granulationsgewebe samt proliferierender Gefäße in beiden Gruppen (*Abbildung 27A und B*).

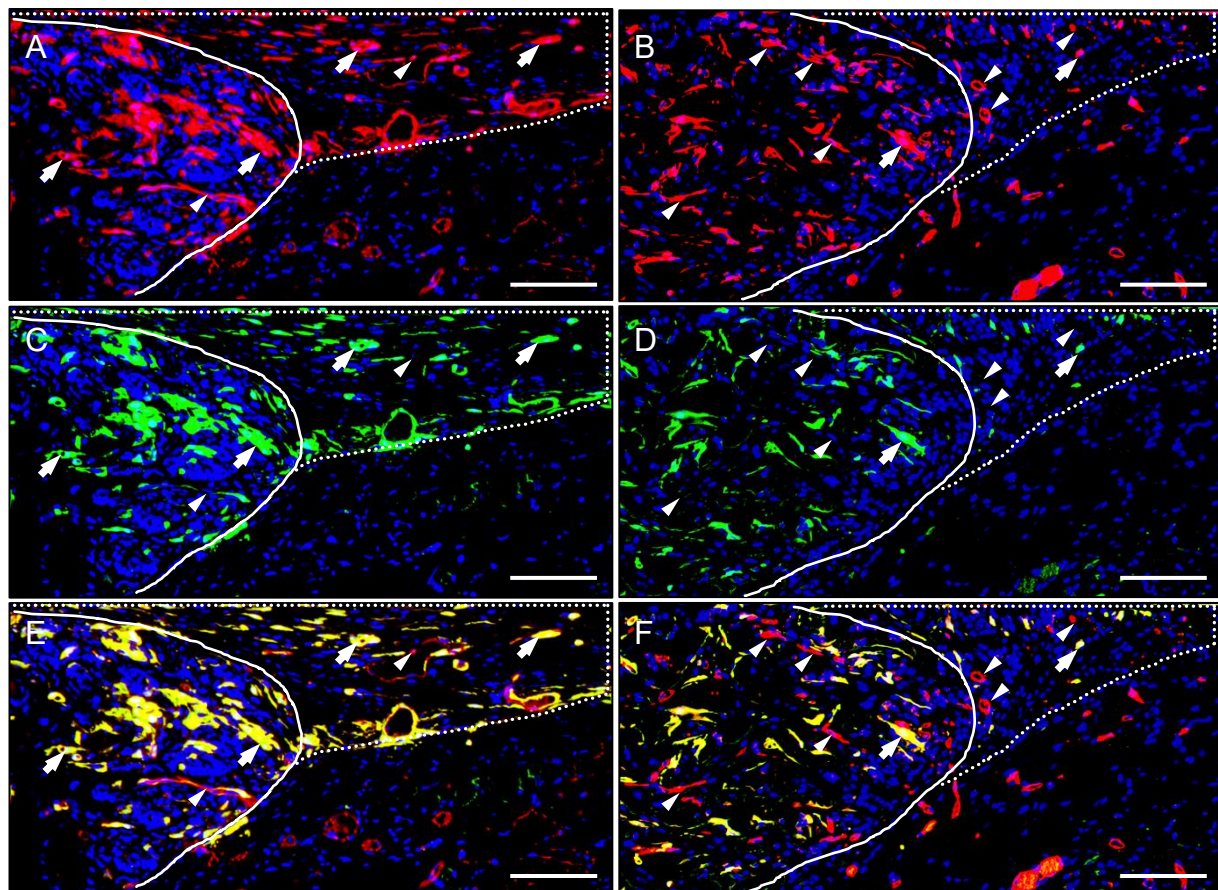


**Abbildung 27:** *A, B:* HE-gefärbte Schnitte von prävascularisierten Scaffolds (Rand markiert durch punktierte Linie) und angrenzendem Rückenhautkammerngewebe am 14. Tag nach Implantation auf die quergestreifte Hautmuskulatur (Pfeilspitzen) von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (A) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (B) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Im Randbereich der Implantate ist neuformiertes Granulationsgewebe (Sterne) erkennbar. Maßstab: A, B = 420 µm.

Der Kollagengehalt wurde durch eine zusätzliche Sirius Red-Färbung visualisiert. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (*Abbildung 28A – C*). Dies belegt eine vergleichbare Neubildung von Granulationsgewebe innerhalb der Scaffolds und eine gute Inkorporation der Implantate in das umliegende Kammerngewebe der Empfängermäuse.

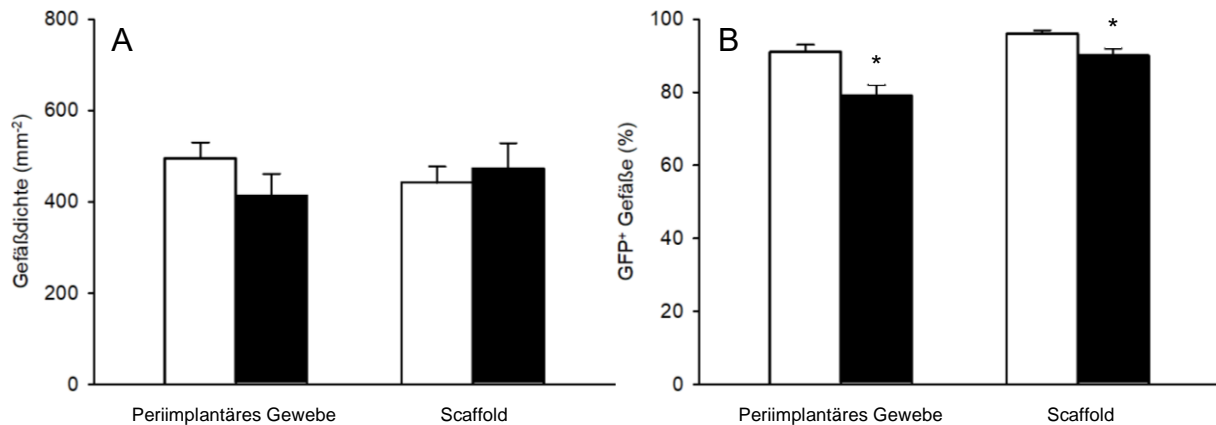


**Abbildung 28:** A: Kollagengehalt (Scaffold/Haut) von prävascularisierten Scaffolds am 14. Tag nach Implantation. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in 1  $\mu$ M IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (Kontrolle; weißer Balken; n = 8) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (schwarzer Balken; n = 8) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Mittelwert  $\pm$  SEM. B, C: Sirius Red-gefärbte Schnitte von zentralen Bereichen prävascularisierter Scaffolds am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen. Die Gefäßfragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (B) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (C) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Maßstab: 80  $\mu$ m.



**Abbildung 29:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von prävascularisierten Scaffolds (Rand markiert durch weiße Linie) und angrenzendem Rückenhautkammerngewebe (Rand markiert durch weiße punktierte Linie) am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (A, C, E) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (B, D, F) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Die Färbung der Schnitte erfolgte mittels Hoechst 33342 (A – F; blau) zur Darstellung der Zellkerne, eines Antikörpers gegen CD31 (A, B; rot) zur Detektion der Endothelzellen und eines Antikörpers gegen GFP (C, D; grün). E, F: Überlagerung von A und C bzw. von B und D. Pfeile = GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße und Pfeilspitzen = GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße. Maßstab: A – F = 140  $\mu$ m.





**Abbildung 30: A, B:** Gefäßdichte (A; mm<sup>-2</sup>) und GFP<sup>+</sup> Gefäße (B; %) innerhalb von prävascularisierten Scaffolds sowie im angrenzenden Rückenhautkammerngewebe am 14. Tag nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW Lösung kultiviert und direkt (Kontrolle; weiße Balken; n = 8) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (schwarze Balken; n = 8) auf die Scaffolds gesiedelt und implantiert. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Durch immunhistochemische Analysen konnte das Granulationsgewebe in den Poren der Scaffolds und im angrenzenden Kammerngewebe detaillierter analysiert werden. Dabei wurde innerhalb aller Scaffolds eine vergleichbare Dichte von CD31<sup>+</sup> Gefäßen nachgewiesen (Abbildung 29A – F, 30A). Im angrenzenden Rückenhautkammerngewebe zeigte sich in der Kontrollgruppe eine erhöhte Anzahl an CD31<sup>+</sup> Gefäßen. Die Unterschiede erwiesen sich aber nicht als statistisch signifikant (Abbildung 30A). Der Anteil an GFP<sup>+</sup> Gefäßen war in der Kryo-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Allerdings lag der Anteil an GFP<sup>+</sup> Gefäßen in beiden Gruppen bei über 79 % (Abbildung 30B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Scaffolds hauptsächlich durch die besiedelten GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente vaskularisiert wurden und die Gefäßfragmente darüber hinaus in das umliegende Gewebe aussprossen.

Zusammengefasst konnten die intravitalmikroskopischen und immunhistochemischen Ergebnisse belegen, dass die Kryokonservierung zu einer langsameren Vaskularisierung und Gefäßreifung innerhalb der implantierten Scaffolds führte. 14 Tage nach Implantation wurde in beiden Gruppen allerdings eine vergleichbar gute Gefäßdichte nachgewiesen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine Kryokonservierung Auswirkungen auf das Vaskularisierungspotential von IGF-1-stimulierten mikrovaskulären Fragmenten hat und die Vaskularisierung von Scaffolds in den ersten Tagen nach Implantation verringert.

## 6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der Effekt einer Stimulation mit IGF-1 bzw. einer IGF-1-Stimulation mit anschließender Kryokonservierung auf das Vaskularisierungspotential von mikrovaskulären Gefäßfragmenten analysiert.

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

1. Eine Kultivierung in IGF-1-supplementierter UW-Lösung hat im Vergleich zu einer Kultivierung in Vehikel-supplementierter UW-Lösung keinen Effekt auf die zelluläre Zusammensetzung von mikrovaskulären Fragmenten. Alle Gefäßfragmente weisen nach der Kultivierungsphase einen vergleichbaren Anteil an Endothelzellen, Perizyten, Stroma- und Stammzellen auf.
2. Eine IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente führt zu einer höheren Ausschüttung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, VEGFR-2 und MMP-2. Eine zusätzliche Kultivierung mit IGFbp4 inhibiert diese vermehrte Expression nicht. Zudem weisen IGF-1-kultivierte Gefäßfragmente deutlich weniger apoptotische endotheliale und perivaskuläre Zellen auf. Somit kann die Viabilität von mikrovaskulären Fragmenten durch eine IGF-1-Stimulation gesteigert werden. Diese protektive Wirkung wird durch die Stimulation mit IGFbp4 wiederum aufgehoben. Auf die proliferative Aktivität der Zellen hat die IGF-1-Kultivierung keinen wesentlichen Effekt.
3. Mikrovaskuläre Gefäßfragmente, die vor ihrer Ansiedlung auf Scaffolds und Implantation mit IGF-1 stimuliert werden, zeigen *in vivo* ein deutlich verbessertes Vaskularisierungspotential. Im Vergleich zu Scaffolds mit Vehikel-kultivierten mikrovaskulären Fragmenten entwickelt sich über einen kürzeren Zeitraum ein reifes, stark perfundiertes Netzwerk. Dies ist erkennbar an einer früher einsetzenden Vaskularisierung, geringeren Gefäßdurchmessern sowie höheren Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten. Zudem verändert die vorausgehende IGF-1-Behandlung die Dichte des Gefäßnetzwerkes innerhalb der Implantate sowie in deren unmittelbarer Umgebung. Intravitalmikroskopische und histologische Analysen belegen ein dichteres



Gefäßwachstum in Scaffolds, die mit IGF-1-kultivierten Gefäßfragmenten besiedelt werden. Sämtliche IGF-1-vermittelten Effekte werden *in vivo* durch die Zugabe von IGFBP4 blockiert.

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

Durch eine Kryokonservierung präkultivierter mikrovaskulärer Fragmente wird die Vaskularisierung von Scaffolds stark beeinträchtigt. Innerhalb von Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten und anschließend kryokonservierten Gefäßfragmenten besiedelt werden, bilden sich im Vergleich zu Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten, aber nicht-kryokonservierten Gefäßfragmenten besiedelt werden, mikrovaskuläre Netzwerke wesentlich langsamer aus und der Reifungsprozess der einzelnen Blutgefäße ist verzögert.

## 7. DISKUSSION

### 7.1 Diskussion von Material und Methodik

#### 7.1.1 Rückenhautkammermodell

Die Rückenhautkammer ist ein etabliertes Modell, um dynamische Prozesse *in vivo* repetitiv zu analysieren. Hierzu zählen die Vaskularisierung autologer oder allogener Transplantate, Wundheilung, Tumorangiogenese oder die Inkorporation implantierter Materialien [SCHREITER et al., 2017]. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte das Modell der Rückenhautkammer eine systematische *in vivo* Analyse der Vaskularisierung von implantierten prävascularisierten Integra®-Scaffolds.

Historisch finden sich erste Beschreibungen einer vergleichswisen Methodik 1924 bei SANDISON, der eine transparente Beobachtungskammer ins Ohr von Kaninchen implantierte, um lokale Gewebeprozesse *in vivo* zu beurteilen. Von ALGIRE wurde dieses Modell 1943 erstmals auf die Rückenhaut von Mäusen übertragen und über die Zeit stetig weiterentwickelt. Heutzutage findet das Modell Einsatz bei Mäusen [CARDON et al., 1970; LEUNIG et al., 1992; LEHR et al., 1993], Ratten [PAPENFUSS et al., 1979] oder Hamstern [ENDRICH et al., 1980]. Jede Tierart bietet dabei gewisse Vor- und Nachteile. Ein Vorteil bei Hamstern ist die vergleichsweise einfache Kammerpräparation, da die mikrochirurgisch zu trennenden Muskelschichten kaum miteinander verwachsen sind und nur wenige vaskuläre Querverbindungen bestehen. Der wesentlich dünnere Unterhautmuskel führt zusätzlich zu einer verbesserten mikroskopischen Bildqualität [LASCHKE et al., 2011b]. Dennoch wird das Modell der Rückenhautkammer aus verschiedenen Gründen zunehmend in Mäusen angewandt. Das Genom von Mäusen wurde noch vor dem anderer Nagetiere im Jahr 2002 komplett sequenziert und ist bisher besser untersucht als das von Ratten oder Hamstern [WATERSTON et al., 2002]. Zudem werden seit den 80er Jahren molekulare Techniken zur gentechnischen Manipulation des Mäusegenoms entwickelt, weshalb eine größere Bandbreite von Knockout-Stämmen und transgenen Mauslinien existiert [LASCHKE et al., 2011b; BRYDA, 2013]. Auch die Haltung der Tiere gestaltet sich

einfacher und ökonomisch günstiger. Da in der vorliegenden Arbeit transgene GFP<sup>+</sup> Tiere und verschiedene Antikörper für immunhistochemische Analysen eingesetzt wurden, eigneten sich Mäuse am besten für die geplanten Untersuchungen.

Das Modell der Rückenhautkammer bietet die Möglichkeit, nach Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen und unter Verwendung hochauflösender intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die terminale Strombahn in Echtzeit zu visualisieren [LEHR et al., 1993]. Bei der Konzipierung des Kammerrahmens wurde ein abnehmbares Deckglas integriert. Dies ermöglicht während des Versuchszeitraums den stetigen Zugang zur Rückenhautkammer mit Visus auf die quergestreifte Hautmuskulatur und dem darunter befindlichen Subkutangewebe samt Mikrozirkulation. Zudem lassen sich Biomaterialien [GHANAATI et al., 2009], Gewebe [VAJKOCZY et al., 2000] oder Arzneimittel [BOULAFTALI et al., 2012] hierdurch ohne größere invasive Eingriffe lokal implantieren bzw. applizieren. Hämodynamische Parameter können unter standardisierten Bedingungen erhoben und mittels computergestützter Systeme ausgewertet werden. Die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten dieses Modells wurden in verschiedenen Übersichtsarbeiten genauer erläutert [LASCHKE et al., 2011b; LASCHKE et al., 2016b]. Beispielsweise kann auf diese Weise die Mikrozirkulation von benignen Gewebetransplantaten [FUNK et al., 1986], die Tumorangiogenese [DEBERGH et al., 2010; LASCHKE et al., 2013] oder die Vaskularisierung von Endometrioseherden [LASCHKE et al., 2007; NENICU et al., 2014] genauer untersucht werden.

Dynamische Prozesse im lebenden Organismus umfassen hoch komplexe Mechanismen auf molekularer sowie zellulärer Ebene, die weder *in vitro* noch *in silico* simuliert werden können [LASCHKE, 2016b]. Bei alternativen Modellen am Tier kann dabei meist nur zu einem einzigen Zeitpunkt eine Untersuchung *in vivo* erfolgen [KUHNLE et al., 1993; TSUKADA et al., 2012; DONNDORF et al., 2013]. Das Rückenhautkammermodell bietet die Option, über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen repetitiv Untersuchungen durchzuführen [MENGER et al., 2002]. Somit eignete sich in der vorliegenden Arbeit die Rückenhautkammer hervorragend für die longitudinale Analyse der Vaskularisierung prävaskularisierter Scaffolds. Der Zeitrahmen der Analysen wird jedoch begrenzt durch die abnehmende Elastizität der Rückenhaut, die zu einem Abkippen der Kammer und zu einer verminderten Perfusion des Gewebes führen kann [LASCHKE et al., 2011b].

Eine einwandfreie Kammerpräparation sowie die Wahl des Kammermaterials spielen eine essentielle Rolle, um die Gewebephysiologie zu erhalten und zuverlässige Messwerte zu erheben. Früher eingesetzte Teflon-beschichtete Aluminiumrahmen [ENDRICH et al., 1980] wurden inzwischen von Kammerrahmen aus Titan abgelöst, die eine höhere Stabilität aufweisen [MENGER et al., 2002]. Auf die Implantation der Rückenhautkammer folgt außerdem eine 48-stündige Ruhephase, in der sich die Tiere vom chirurgischen Trauma sowie der Anästhesie erholen können.

Das Volumen von Biomaterialien, die in die Rückenhautkammer implantiert werden können, ist auf ca. 3 x 3 x 1 mm begrenzt. Zum einen kann nur so ein luftdichter Verschluss der Kammer garantiert werden, zum anderen wäre das Empfängerewebe um das Implantat andernfalls nicht mehr durch das Beobachtungsfenster sichtbar und könnte nicht mit analysiert werden. Eine Untersuchung von klinisch angewandten Implantaten in ihrer Originalgröße ist somit in diesem Modell zwar nicht möglich, verschiedene Materialien können aber unter einheitlichen Bedingungen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Inkorporation und Vaskularisierung analysiert werden [LASCHKE et al., 2011b]. Gleichzeitig können durch den standardisierten Versuchsaufbau Ergebnisse mit früheren Studien verglichen werden [LASCHKE et al., 2016b].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rückenhautkammermodell in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen angewandt. Nach Implantation der mit mikrovaskulären Fragmenten besiedelten Scaffolds in die Rückenhautkammern wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen regelmäßig die Mikrozirkulation analysiert und mikrohämodynamische Parameter erhoben. Dies erlaubte sowohl eine Beurteilung der Entwicklung neuer Blutgefäße als auch der Reperfusion präformierter Gefäßfragmente.

### 7.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine gut etablierte Analysetechnik, die eine Visualisierung und Quantifizierung von dynamischen Prozessen *in vivo* erlaubt. In Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik können beispielsweise die Angiogenese und Vaskulogenese [MENGER et al., 1992a; VAJKOCZY et al., 2000], inflammatorische Gewebereaktionen [VON ANDRIAN et al., 1991] oder Zell-Zell-Interaktionen [LEHR et al.,

1999] in hoher zeitlicher sowie räumlicher Auflösung bis auf subzellulärer Ebene dargestellt werden [JAIN et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie angewandt, um die fortschreitende Vaskularisierung von implantierten prävascularisierten Scaffolds im Rückenhautkammergebe von Mäusen zu analysieren. Durch die Applikation Licht-emittierender Fluoreszenzfarbstoffe wird eine Anfärbung und Kontrastierung von Blutgefäßen im transilluminierbaren Rückenhautkammergebe ermöglicht [CHOI et al., 2015]. Darüber hinaus können durch den Einsatz verschiedener Fluorochrome Vorgänge wie beispielsweise das Fließverhalten zellulärer Blutbestandteile [KAMLER et al., 1997; HOFFMANN et al., 1999], Störungen der Gefäßintegrität [DEBEFVE et al., 2010] sowie Zelltod durch Nekrose oder Apoptose [HARDER et al., 2014] analysiert werden.

Nach Injektion von 0,1 ml FITC-Dextran 150 kDa (5%) in den retrobulbären Venenplexus wurde in der vorliegenden Studie die terminale Strombahn von Mäusen bestehend aus Arteriolen, Kapillaren, postkapillären Venolen und Sammelvenolen visualisiert. Zudem konnte die zunehmende Vaskularisierung der implantierten Scaffolds in der Rückenhautkammer verfolgt werden.

Es existieren alternative Verfahren zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie, um die mikrovaskuläre Perfusion eines Gewebes zu beurteilen, wie die Fluoreszeinperfusographie [LANGE et al., 1942], die Xenon-Clearance-Technik [ROSS et al., 1964], die Thermographie [WINSOR et al., 1964], die photoelektrische Plethysmographie [WEBSTER et al., 1976], die transkutane Messung des Sauerstoffpartialdrucks [Huch et al., 1976], die Laser-Doppler-Flowmetrie [OBERG, 1990] oder die Mikrosphärentchnik [ZWISSLER et al., 1991]. Eine detaillierte Darstellung des Gefäßsystems kann mit den genannten Methoden aber nicht erreicht werden, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz kamen.

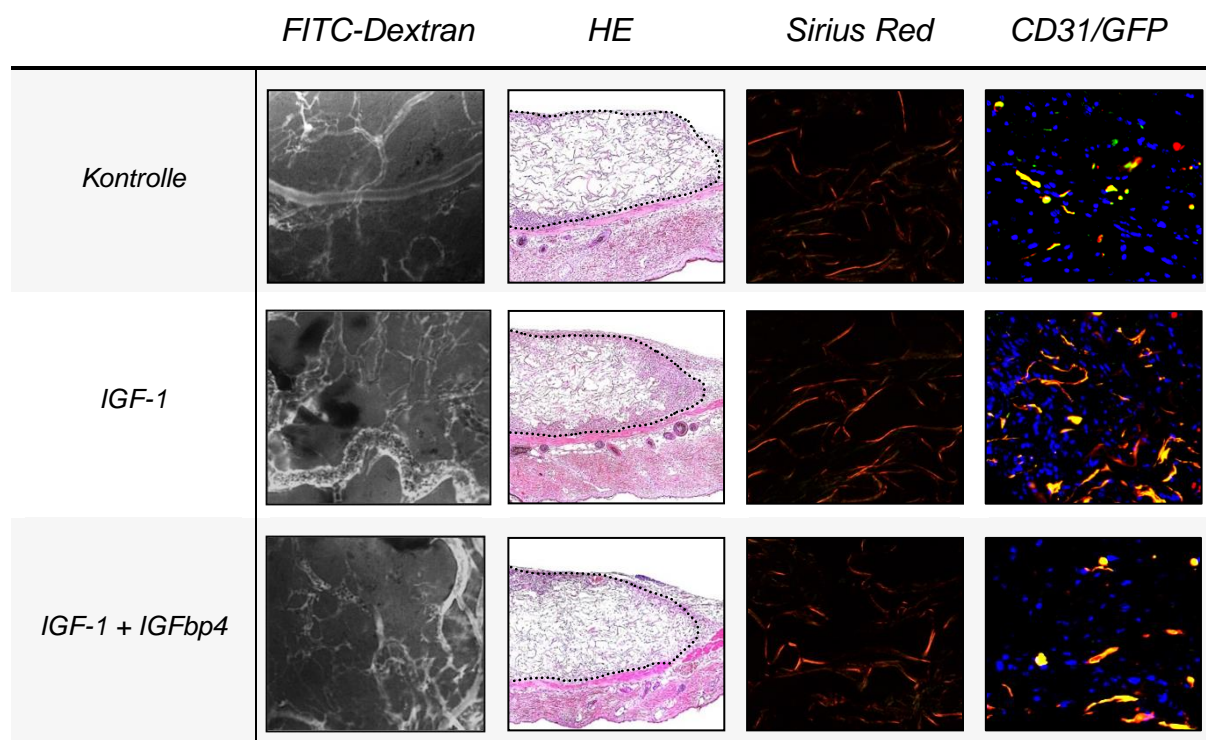
Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen birgt das Risiko der Induktion phototoxischer Effekte auf das Gewebe und der Verfälschung der Messwerte. Abhängig vom gewählten Fluorochrom und dessen Konzentration, der Lichtintensität sowie der Dauer der Belichtung können in unterschiedlich hohem Maße freie

Sauerstoffradikale entstehen [POVLISHOCK et al., 1983; PENNING et al., 1994; STEINBAUER et al., 2000]. Diese führen unter anderem zu einer Thrombozytenaktivierung mit Entstehung von intravaskulären Thromben [ROSENBLUM, 1978; HERRMANN, 1983], Endothelzellschäden [POVLISHOCK et al., 1983], einer erhöhten Gefäßpermeabilität [REED et al., 1988], einer Reduktion der funktionellen Kapillardichte [FRIESENECKER et al., 1994], vermehrten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen [GAWLOWSKI et al., 1989; SAETZLER et al., 1997] oder arteriolen Vasospasmen [SAETZLER et al., 1997]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit an jedem Untersuchungstag die Intravitalmikroskopie bei jedem Tier auf 20 Minuten beschränkt. Zudem wurde FITC-Dextran 150 kDa nach der von STEINBAUER [2000] empfohlenen Dosierung appliziert und die Lichtintensität auf ein Minimum reduziert, um phototoxische Effekte zu verhindern. Damit die Belichtungs- und Narkosedauer auf das notwendige Mindestmaß verkürzt werden konnten, wurden sämtliche intravitalmikroskopischen Untersuchungen auf DVD gesichert und zeitversetzt offline und ohne zusätzliche Beeinträchtigung der Versuchstiere ausgewertet [PRIES, 1988; KLYSCZ et al., 1997].

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1 IGF-1-Stimulation mikrovaskulärer Fragmente**

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Kultivierung in IGF-1-supplementierter UW-Lösung das Vaskularisierungspotential mikrovaskulärer Fragmente steigert. Die 24-stündige *in vitro* Behandlung mit IGF-1 förderte die Viabilität der Gefäßfragmente sowie deren Expression pro-angiogener Wachstumsfaktoren. Entsprechend entwickelten sich in Scaffolds, die mit IGF-1-inkubierten Gefäßfragmenten besiedelt wurden, wesentlich schneller dichtere Gefäßnetzwerke im Vergleich zu Scaffolds mit Vehikel- oder IGF-1 + IGFbp4-inkubierten mikrovaskulären Fragmenten (*Tabelle 6*).



**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Studienabschnitts. Aufnahmen von links nach rechts: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (unter Blaulicht-Epi-Illumination; Kontrastverstärkung mittels intravenöser Injektion von 0,1 ml 5 % FITC-Dextran 150 kDa), Histologie (HE-Färbung) und Immunhistochemie (Sirius Red-Färbung und CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung). Die Analysen erfolgten am Modell der Rückenhautkammer in C57BL/6 Mäusen. Nach Abschluss des 14-tägigen Untersuchungszeitraums wurde das Rückenhautkammerngewebe asserviert und mit HE und Sirius Red sowie Antikörpern gegen CD31 und GFP gefärbt. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in Vehikel- (Kontrolle), IGF-1- oder IGF1 + IGFbp4-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert. Die Stimulation mit IGF-1 führte zu einer schnelleren und dichteren Vaskularisierung der Scaffolds im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen.

Isolierte mikrovaskuläre Fragmente sind natürliche Vaskularisierungseinheiten, die aufgrund ihrer hohen angiogenen Aktivität zur Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten im Tissue Engineering eingesetzt werden. Vorhergehende Studien belegten bereits eine verbesserte Vaskularisierung mittels mikrovaskulärer Fragmente bei epikardialen Patches [SHEPHERD et al., 2007], Hautersatzverfahren [FRUEH et al., 2017a] sowie Muskel- [PILIA et al., 2014] oder Knochendefekten [ORTH et al., 2018]. Dabei besteht die Möglichkeit, die mikrovaskulären Fragmente vor Implantation einer 24-stündigen Kultivierungsphase zu unterziehen. Während der Kultivierung kann durch die Zugabe von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren das Vaskularisierungspotential der mikrovaskulären Fragmente zusätzlich gesteigert werden [KARSCHNIA et al., 2018; LASCHKE et al., 2019a]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich IGF-1 als Supplement zur Stimulation von Gefäßfragmenten hervorragend eignet.

Der Grund für den stimulatorischen Effekt von IGF-1 auf die mikrovaskulären Fragmente beruht auf der metabolischen Stimulierbarkeit des Gefäßnetzwerkes innerhalb von Fettgewebe. Erhöhte Insulinspiegel, wie sie bei einer hochkalorischen Diät auftreten, induzieren im Fettgewebe eine Proliferation des Gefäßsystems [CAO, 2013]. Die Signaltransduktion erfolgt hierbei über eine gesteigerte IGF-1-Ausschüttung und eine reduzierte IGFbp4-Sekretion [GEALEKMAN et al., 2014]. Dies bestätigte sich in den vorliegenden Analysen. Die Stimulation mit IGF-1 hatte keine Auswirkungen auf die zelluläre Zusammensetzung der isolierten mikrovaskulären Fragmente. Dagegen steigerte sie signifikant die Expression von VEGF, VEGFR-2 und MMP-2. Die zusätzliche Exposition der Fragmente gegenüber IGFbp4 minderte die pro-angiogene Aktivität von IGF-1 nicht. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass IGF-1 die Expression von VEGF, VEGFR-2 und MMP-2 über IGF-1-Rezeptor unabhängige Signalwege induziert. Auch eine Verfehlung des IGF-1 Moleküls durch IGFbp4 wäre denkbar. Alternativ könnte die Ursache in einer falschen Dosierung von IGF-1 und IGFbp4 liegen. Eine zu niedrige Konzentration an IGFbp4 hätte zur Folge, dass ein Großteil der IGF-1 Moleküle ungebunden bleibt und deren stimulatorische Wirkung weiterhin über den IGF-1-Rezeptor vermittelt werden kann. IGF-1 und IGFbp4 wurden zeitgleich zu den mikrovaskulären Fragmenten gegeben und nach einer 24-stündigen Kultivierungsphase ausgewaschen. Vorstellbar wäre daher auch, dass IGFbp4 eine längere Inkubationszeit benötigt, um IGF-1 vollständig zu blockieren. Die Experimente in der vorliegenden Arbeit basieren jedoch auf den Protokollen und Ergebnissen früherer Studien, die bei genannter Dosierung und Inkubationszeit der beiden Supplemente eine effiziente Antagonisierung von IGF-1 durch IGFbp4 belegen. Verschiedene Angiogenese-Assays bestätigen, dass die pro-angiogene Wirkung von IGF-1 durch 0,5 µg/ml IGFbp4 bei IGF-1-Konzentrationen von bis zu 10 µM [MORENO et al., 2006; GEALEKMAN et al., 2014] blockiert wird.

Darüber hinaus zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass durch 1 µM IGF-1 die Apoptoserate von Endothelzellen und Perizyten während der Kultivierungsperiode signifikant reduziert werden kann. Dieser Effekt wurde durch eine Zugabe von 0,5 µg/ml IGFbp4 vollständig blockiert. Auch in der Literatur wird vielfach der anti-apoptotische Effekt von IGF-1 beschrieben, unter anderem auf mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes [GEHMERT et al., 2008], Fibroblasten [HARRINGTON et al., 1994; VALENTINIS et al., 1999] und Linsenepithelzellen [CHANDRASEKHER et al.,



2004]. Auch eine zytoprotektive Wirkung im Kontext des Morbus Alzheimer-assoziierten Nervenzelltods wird angeführt [NIIKURA et al., 2001]. Die anti-apoptotische Wirkung des Wachstumshormons IGF-1 wird nach Aktivierung des IGF-1-Rezeptors insbesondere über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert [PÁRRIZAS et al., 1997; ZHENG et al., 2002]. Entscheidend bei der Apoptoseinduktion in Endothelzellen ist die gestörte Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, die einen Ausstrom von Cytochrom c ins Zytosol bedingt [REED, 1997]. Folglich formiert sich ein Zelltod-induzierender Signalkomplex (DISC) [LI et al., 1997], welcher mittels Rekrutierung verschiedener Effektor-Caspasen schließlich die Apoptose und damit verbundene Vorgänge, wie die Kondensation und Degradierung der DNA, einleitet. Die durch IGF-1 aktivierte Proteinkinase Akt inhibiert pro-apoptotische Proteine der Zelltod-induzierenden Signalkaskade wie Bad, Caspase-3, -9 und forkhead-box-Proteine (FOX) [LI et al., 2003; HAO et al., 2011], während anti-apoptotische Faktoren, wie der nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [KANE et al., 1999] und das mouse double minute 2 homolog (MDM2) [MAYO et al., 2001], aktiviert werden. Auf diese Weise verhindert IGF-1 bei einer Vielzahl von Zellen die Apoptose.

Des Weiteren induziert IGF-1 über den PI3K/Akt-Signalweg die Aktivierung zusätzlicher intrazellulärer Kaskaden, welche die Proliferation von Endothelzellen sowie perivaskulären Zellen induzieren [WANG et al., 2014; SABATER et al., 2017]. Diese proliferativen Effekte von IGF-1 konnten in den immunhistochemischen Analysen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht belegt werden. Nach Kultivierung der mikrovaskulären Fragmente in Vehikel-, IGF-1- oder IGF-1 + IGFbp4-supplementiertem Medium wurde in allen drei Gruppen eine vergleichbare Anzahl Ki67<sup>+</sup> proliferativer Endothelzellen und Perizyten detektiert. Zurückzuführen ist dieses Ergebnis möglicherweise auf die hypothermen Kultivierungsbedingungen bei 4 °C. Wie in früheren Studien beobachtet werden konnte, hemmt eine Hypothermie die proliferative Aktivität von Zellen [LEE et al., 2002; DRABEK et al., 2009]. Dennoch wurden die Kultivierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei 4 °C durchgeführt, da diese Temperatur optimale Voraussetzungen für eine Stimulation von mikrovaskulären Fragmenten in UW-Lösung bietet. Abweichende Temperaturen führen zu einer Agglomeration der Gefäßfragmente und folglich einer inhomogenen und somit insuffizienten Besiedlung von Integra<sup>®</sup>-Scaffolds [LASCHKE et al., 2019b]. Bereits seit Jahrzehnten wird UW-Lösung für die Kaltkonservierung von Organen in

der Transplantationschirurgie eingesetzt. Die Verwendung von UW-Lösung als „Kulturmedium“ in vorliegender Studie bot somit die Möglichkeit, mikrovaskuläre Fragmente GMP-konform zu kultivieren. Zudem beinhaltet die Lösung im Gegensatz zu anderen Nährmedien keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren, welche die Ergebnisse der vorliegenden Studien hätten verfälschen können. Hohe IGF-1-Blutspiegel stehen im Zusammenhang mit einer erhöhten Rate an Neoplasien [POLLAK et al., 2004]. Um potentielle Nebenwirkungen des Wachstumshormons zu vermeiden, wie sie bei einer topischen oder venösen Applikation des Wachstumshormons *in vivo* auftreten könnten, wurden die Gefäßfragmente kurzzeitig *ex vivo* stimuliert und anschließend gewaschen.

Die fortschreitende Vaskularisierung prävaskularisierter Scaffolds wurde intravitalmikroskopisch über einen 14-tägigen Versuchszeitraum untersucht. In Analogie zu den vorherig erhobenen *in vitro* Ergebnissen entwickelten sich in Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten Gefäßfragmenten besiedelt wurden, wesentlich rascher mikrovaskuläre Netzwerke. Bereits am dritten Tag nach Implantation war eine signifikant höhere Anzahl perfundierter ROIs in der IGF-1-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen nachzuweisen. Eine frühzeitig einsetzende Perfusion neu entstehender Blutgefäße fördert auch das vaskuläre Remodelling [BAEYENS, 2018]. Zudem verbesserte IGF-1 die Reifung von Blutgefäßen, was mit reduzierten Gefäßdurchmessern sowie erhöhten Blutzellgeschwindigkeiten und Scherraten einherging. Aufgrund wandstabilisierender Perizyten, die sich in fortgeschrittenen Phasen der Angiogenese den Gefäßen anlagern, kommt es zu einer Abnahme der Gefäßdurchmesser [CARMELIET, 2000]. Zudem stellen hohe Scherraten einen pro-angiogenen Reiz dar [GALIE et al., 2014]. Es ist daher anzunehmen, dass diese Mechanismen essentiell zur Vaskularisierung der Scaffolds beitrugen. Letztlich wiesen Scaffolds, die mit IGF-1-stimulierten Gefäßfragmenten besiedelt wurden, eine beschleunigte Reifung der Gefäße und ein signifikant dichteres kapilläres Netzwerk auf.

Im Anschluss an den 14-tägigen Untersuchungszeitraum erfolgten histologische und immunhistochemische Analysen der implantierten Scaffolds. Dabei war der Randbereich von Scaffolds mit IGF-1-stimulierten Gefäßfragmenten am dichtesten von neugebildetem Granulationsgewebe durchwachsen. Dies kann als

stärkere Inkorporation der Implantate infolge einer verbesserten Vaskularisierung interpretiert werden. Tatsächlich wiesen Scaffolds, welche mit IGF-1-inkubierten Fragmenten beladen worden waren, die höchste Dichte an CD31<sup>+</sup> Blutgefäßen auf. In den Scaffolds aller drei Gruppen war der Anteil an GFP<sup>+</sup> Gefäßen mit über 80 % vergleichsweise hoch. Daraus kann geschlossen werden, dass die Vaskularisierung aller Implantate hauptsächlich von den präformierten GFP<sup>+</sup> mikrovaskulären Fragmenten getragen wird. Während die Gefäßdichte an CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Blutgefäßen in der IGF-1-Gruppe am höchsten lag, unterschied sich der prozentuale Anteil an GFP<sup>+</sup> Gefäßen zwischen den Gruppen nicht. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass IGF-1 nicht nur die Viabilität der präformierten GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmente verbesserte und deren Gefäßaussprossungen in das umliegende Empfängergewebe stimulierte, sondern gleichzeitig auch die Angiogenese von GFP<sup>-</sup> Blutgefäßen förderte. Diese GFP<sup>-</sup> Gefäße des Empfängertieres proliferierten dementsprechend im umliegenden Kammergewebe und wuchsen stärker in die Implantate ein.

Zusammenfassend konnte im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass IGF-1 die Viabilität, die angiogene Aktivität und die Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten *in vitro* und *in vivo* deutlich verbessert. IGF-1-aktivierte Gefäßfragmente könnten daher zukünftig zu einer schnelleren und besseren Vaskularisierung von Implantaten beitragen.

### 7.2.1.1 Klinische Perspektiven

Mikrovaskuläre Fragmente können relativ einfach aus Fettgewebe isoliert werden und eignen sich aufgrund ihrer hohen Vaskularisierungskapazität zur Prävaskularisierung von Implantaten. Bis zur Entwicklung eines mikrovaskulären Netzwerks aus Gefäßfragmenten vergehen dennoch einige Tage [LASCHKE et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die angiogene Aktivität von mikrovaskulären Fragmenten durch eine 24-stündige Kultivierung mit dem Wachstumshormon IGF-1 deutlich verbessert werden kann.

In der klinischen Praxis könnte die Kurzzeitkultivierung mit IGF-1 eine attraktive Möglichkeit darstellen, die Vaskularisierungskapazität von isolierten Gefäßfragmenten

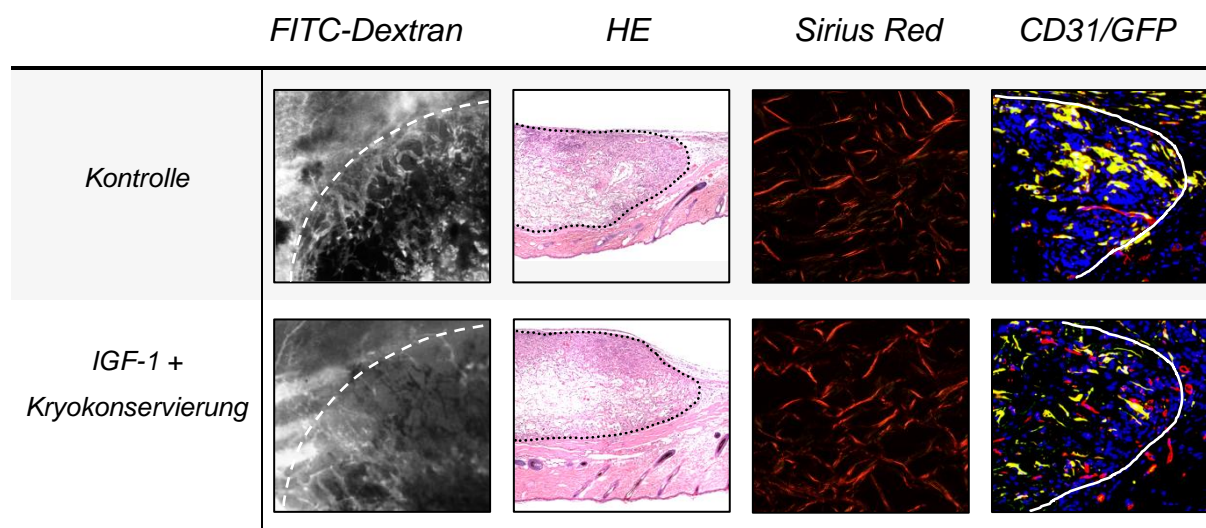
vor ihrem Transfer in den Patienten zu steigern. Insbesondere bei zeitaufwändigen, mehrschrittigen Operationsverfahren können mikrovaskuläre Fragmente gegebenenfalls nicht direkt nach ihrer Isolation in den Patienten transferiert werden. Diese Latenzphase würde sich für eine Stimulierung mit IGF-1 anbieten.

In zukünftigen Studien könnte zusätzlich untersucht werden, ob durch eine kürzere Inkubation mit IGF-1 die Vaskularisierungskapazität von mikrovaskulären Fragmenten ebenfalls gesteigert werden kann. Dies würde einen schnelleren Transfer der Gefäßfragmente in den Patienten, möglicherweise während eines einzigen operativen Eingriffs, erlauben.

Eine weitere interessante Fragestellung wäre, ob die stimulierenden Effekte einer IGF-1-Kultivierung auch bei isoliertem Fettgewebe nachweisbar sind. Als klinisches Beispiel wäre die autologe Fetttransplantation anzuführen, ein Verfahren welches vorwiegend sekundär-rekonstruktiv in Folge von traumatischem, alters- oder krankheitsbedingtem Weichteilverlust eingesetzt wird. Dabei muss mit einem postoperativen Volumenschwund der Fetttransplantate von 20 – 90 % gerechnet werden [DOORNAERT et al., 2019]. Denkbar wäre daher, das Fett nach Entnahme bis zur weiteren Prozessierung und Reimplantation in IGF-1-supplementiertem Medium aufzubewahren, um seine Vitalität und Überlebensfähigkeit zu steigern.

### 7.2.2 Präkultivierung und Kryokonservierung mikrovaskulärer Fragmente

Die Kryokonservierung beschreibt ein Verfahren, welches die Langzeitlagerung von Organellen, Zellen, Geweben und anderen biologischen Strukturen bei Temperaturen von -196 °C ermöglicht [JANG et al., 2017]. Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden IGF-1-präkultivierte Gefäßfragmente kryokonserviert, auf Scaffolds gesiedelt und nach Implantation in Rückenhautkammern über einen 2-wöchigen Zeitraum analysiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Gefäßfragmente *in vivo* proliferieren und nach vierzehn Tagen ein dichtes und perfundiertes mikrovaskuläres Gefäßsystem ausbilden. Durch die Kryokonservierung wurde der Reifungsprozess des Gefäßsystems aber verzögert und die Vaskularisierungskapazität der Gefäßfragmente reduziert (*Tabelle 7*).



**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Studienabschnitts. Aufnahmen von links nach rechts: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (unter Blaulicht-Epi-Illumination; Kontrastverstärkung mittels intravenöser Injektion von 0,1 ml 5 % FITC-Dextran 150 kDa), Histologie (HE-Färbung) und Immunhistochemie (Sirius Red-Färbung und CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung). Die Analysen erfolgten am Modell der Rückenhautkammer in C57BL/6 Mäusen. Nach Abschluss des 14-tägigen Untersuchungszeitraums wurde das Rückenhautkammerngewebe asserviert und mit HE und Sirius Red sowie Antikörpern gegen CD31 und GFP gefärbt. Die mikrovaskulären Fragmente wurden für 24 h in IGF-1-supplementierter 4 °C UW-Lösung kultiviert und direkt (Kontrolle) oder nach 7-tägiger Kryokonservierung (IGF-1 + Kryo) auf Scaffolds gesiedelt und implantiert. Kryokonservierte Gefäßfragmente bildeten wesentlich langsamer ein mikrovaskuläres Netzwerk in vivo aus. Nach Abschluss des 14-tägigen Untersuchungszeitraums war dagegen in beiden Gruppen eine vergleichbar dichte Vaskularisierung und Inkorporation der Scaffolds nachzuweisen.

In einer vorangehenden Studie wurde bereits gezeigt, dass die Kryokonservierung eine geeignete Methode zur Langzeitlagerung von isolierten mikrovaskulären Fragmenten darstellt [LASCHKE et al., 2018]. Dabei zeigte sich, dass kryokonservierte Gefäßfragmente in gleichem Maß wie frisch isolierte Gefäßfragmente zur Vaskularisierung und Inkorporation von implantierten Scaffolds beitragen. Weder die Morphologie und Länge der mikrovaskulären Fragmente noch ihre zelluläre Zusammensetzung werden durch die Kryokonservierung beeinflusst. Vor dem Hintergrund des ersten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit bot die Kryokonservierung eine vielversprechende Möglichkeit, den stimulierenden Effekt einer IGF-1-Kultivierung auf mikrovaskuläre Fragmente für längere Zeit zu erhalten. Die intravitalmikroskopischen Analysen des zweiten Studienabschnitts konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Die Kryokonservierung führte zu einer verzögerten Ausreifung des Gefäßsystems, erkennbar an erhöhten Gefäßdurchmessern und erniedrigten Blutzellgeschwindigkeiten bzw. Scherraten innerhalb der einzelnen Gefäße und einer verzögerten Vaskularisierung der implantierten Scaffolds (Tabelle 7).

Um Gefrierschäden während der Kryokonservierung der mikrovaskulären Fragmente zu verhindern, wurde in der vorliegenden Arbeit das Kryoprotektivum DMSO eingesetzt. Bereits in mehreren Studien wurde DMSO erfolgreich zur Kryokonservierung von biologischem Material, wie beispielsweise mesenchymalen Stammzellen, Langerhans-Inseln oder Blutgefäßen, verwendet [KOTOBUKI et al., 2005; MENGER et al., 1992b; MÜLLER-SCHWEINITZER, 2009]. Bislang gilt der Einsatz von DMSO als Kryoprotektivum bei der Kryokonservierung von verschiedenen Zelltypen immer noch als Goldstandard [WHALEY et al., 2021]. Konzentrations- und temperaturabhängig kann DMSO aber Einfluss auf zelluläre Vorgänge nehmen. Unter anderem wurde eine veränderte Genexpression bei Stammzellen, Kardiomyozyten und Hepatozyten nachgewiesen, die in DMSO-supplementierter Lösung inkubiert wurden [IWATANI et al., 2006; VERHEIJEN et al., 2019]. KOIZUMI et al. [2003] belegten einen anti-angiogenen Effekt von DMSO auf Endothelzellen, die auf einer Matrigel®-Matrix angesiedelt wurden. Demnach verhindert DMSO die Entwicklung von kapillären Gefäßausprossungen durch eine Suppression der endothelialen MMP-2 Produktion. ALTAN et al. [2017] untersuchten den Einfluss einer topischen Applikation von DMSO auf die Hornhaut von Kaninchen nach lokaler Augenverätzung. DMSO hemmte dabei die Neovaskularisierung der Hornhaut und führte an Untersuchungstag 7 und 10 zu einer reduzierten VEGF-Expression der Endothelzellen. Wie Western Blot-Analysen des ersten Studienabschnitts zeigen konnten, wird die Expression von VEGF und MMP-2 durch mikrovaskuläre Fragmente nach einer IGF-1-Kultivierung dagegen angeregt. DMSO hemmt auch die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* durch die Blockade der Zellprogression während des Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang und führt zu einem erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen [YI et al., 2017]. Die beschriebenen anti-angiogenen und pro-apoptotischen Effekte von DMSO werden bei tiefen Temperaturen abgeschwächt [BEST, 2015]. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Inkubation in DMSO-supplementiertem Medium während der Einfrier- und Auftauphase auch Auswirkungen auf IGF-1-aktivierte Signalwege von Endothelzellen hat und somit in der vorliegenden Arbeit das Vaskularisierungspotential der mikrovaskulären Fragmente beeinflusste.

Tiefe Temperaturen versetzen Zellen in einen Stresszustand und führen zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Prozesse. Die Proteinsynthese wird größtenteils gehemmt, weshalb weder Wachstum noch Zellteilung möglich sind

[FUJITA, 1999]. Eine Ausnahme bilden sogenannte Kälteschockproteine (CSP), die als Reaktion auf die hypothermen Bedingungen sogar vermehrt gebildet werden. CSP beeinflussen unter anderem die Transkription sowie Translation und spielen eine wichtige Rolle bei der Faltung und Stabilisierung von RNA. Die genaue Funktion der CSP in eukaryotischen Zellen ist zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht vollständig geklärt [DRESIOS et al., 2005; ROOBOL et al., 2009]. Zudem wird durch den Kältestress der Zellzyklus und Zellmetabolismus verändert. Bereits unter 20 °C wird die Funktionsfähigkeit der Zelle beeinträchtigt und stoffwechselphysiologische Prozesse laufen langsamer ab. Fällt die Umgebungstemperatur auf unter -130 °C werden fast alle zellulären Reaktionen eingestellt, da unter diesen Bedingungen nicht mehr ausreichend Energie für metabolische Prozesse zur Verfügung steht [SCHMITZ, 2011]. Bei -196 °C während einer Kryokonservierung steht der Stoffwechsel komplett still und der Zellzyklus wird unterbrochen, wobei die meisten Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase wechseln und in dieser überdauern [AL-FAGEEH & SMALES, 2006]. Dies hat zur Folge, dass auch sämtliche IGF-1-induzierte Signalwege beeinflusst werden. IGF-1 stimuliert insbesondere über den PI3K/Akt-Signalweg die Zellprogression von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase, in der die DNA-Synthese und -Replikation als Vorbereitung für die spätere Zellteilung in der M-Phase stattfinden [DELAFONTAINE et al., 2004; MAIRET-COELLO et al., 2009]. Der Zellzyklus und somit die Proliferation von Zellen werden durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) gesteuert. Diese können durch Cycline aktiviert bzw. durch CDK-Inhibitoren (CKI) gehemmt werden. MAIRET-COELLO et al. [2009] konnten nachweisen, dass IGF-1 *in vivo* die Cycline D und E hochreguliert, während die Expression der CKI p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup> gehemmt wird. Umgekehrt führte eine Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs *in vivo* zu einer verminderten DNA- und Cyclin E-Synthese und erhöhten p27<sup>KIP1</sup>- und p57<sup>KIP2</sup>-Leveln. Bei Hypothermie werden IGF-1-vermittelte Signalwege unterbrochen oder stress-aktivierte Signalwege, wie beispielsweise der p53-p21- oder der Rho-assoziierte Kinase (ROCK)-Signalweg, überlagern die Effekte einer IGF-1-Stimulation [MATIJASEVIC et al., 1998; XU et al., 2010]. Die Aktivierung dieser kälte-assoziierten Signalwege führt dazu, dass ein Großteil der Zellen in den Zellarrest übergeht und in einigen Zellen sogar die Apoptose eingeleitet wird [RIEDER & COLE, 2002].

Steigt die Umgebungstemperatur auf über 20 °C, können vitale Zellen wieder reaktiviert werden [MUNDER et al., 2016]. Dabei durchlaufen die Zellen eine

Erholungsphase, in der sich die Zellviabilität, metabolische Aktivität und Funktionalität wieder normalisieren und die Apoptoserate sinkt [BAHSOUN et al., 2020]. Die Dauer dieser Periode ist dabei abhängig von der Zellart. DEVINE et al. [2018] untersuchten massenzytometrisch den Einfluss einer Kryokonservierung auf Primärzellkulturen, die aus Knochenmarkaspiraten gewonnen wurden, und auf die Leukämie-Zelllinien HL-60 und MOLM-13. Alle Zelltypen zeigten dabei über 48 h nach Kryokonservierung eine gestörte Verteilung der einzelnen Zellzyklus-Phasen. ANTEBI et al. [2019] belegten, dass kryokonservierte mesenchymalen Stammzellen (MSC) nach einer 24-stündigen Kultivierung Apoptose-induzierende Gene weniger und anti-inflammatorische Gene sowie das Gen für den Wachstumsfaktor VEGF verstärkt exprimieren. Die Proliferationskapazität von MSC und das Differenzierungspotential zu Endothelzellen wird durch eine Kryokonservierung langfristig nicht beeinflusst [HAACK-SORENSEN et al., 2007]. Mehrere Studien zeigen aber, dass MSC über 24 h benötigen, um ihre Funktionalität nach einer Kryokonservierung wiederherzustellen [FRANÇOIS et al., 2012; CHINNADURAI et al., 2014; BAHSOUN et al., 2020]. Auch Endothelzellen benötigen nach einer Kryokonservierung einige Zeit, um ihren Zellmetabolismus an die veränderten Umgebungsbedingungen anzupassen. Wie LEHLE et al. [2005] belegen konnten, ist diese sogenannte lag-Phase, in der noch kein Zellwachstum stattfindet, im Vergleich zu frischen, kultivierten Endothelzellen um 36 – 50 h verlängert. Nach dieser Phase weisen kryokonservierte und frische Endothelzellen eine identische Verdopplungszeit auf und erreichen in Kultur dieselbe maximale Zelldichte.

Diese Erkenntnisse über eine verlängerte Regenerationszeit von Zellen nach einer Kryokonservierung spiegeln sich auch in den Ergebnissen der intravitalmikroskopischen Analysen der vorliegenden Arbeit wider. Erste Zeichen der Angiogenese konnten hierbei erst am 6. Tag nach Implantation der prävascularisierten Scaffolds nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe dies bereits an Tag 3 der Fall war. Die Angiogenese, d.h. die Aussprossung von Gefäßen aus bereits bestehenden Blutgefäßen, setzt die Proliferation und Migration von Endothelzellen voraus [RISAU, 1997]. Die verzögerte Vaskularisierung der Scaffolds könnte somit durch einen vorübergehend gestörten Zellmetabolismus aufgrund der Kryokonservierung begründet sein. Am Ende des 14-tägigen Versuchszeitraums konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede mehr bzgl. der funktionellen



Kapillardichte zwischen der Gruppe der kryokonservierten und nicht-kryokonservierten Gefäßfragmente festgestellt werden. Dies bestätigen auch die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen. Die Scaffolds beider Gruppen wurden gut in das Empfängergewebe inkorporiert und es konnte eine vergleichbare Gefäßdichte innerhalb der Scaffolds sowie im umliegenden Kammergewebe nachgewiesen werden. Weiterhin lag in beiden Gruppen der Anteil der GFP<sup>+</sup> Gefäße bei mindestens 79 %. Die Vaskularisierung der Scaffolds wurde somit hauptsächlich von den mikrovaskulären Fragmenten getragen.

Zusammenfassend konnte im 2. Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich eine Kryokonservierung nicht eignet, um das hohe Vaskularisierungspotential von IGF-1-präkultivierten mikrovaskulären Fragmenten zu erhalten. Die Kryokonservierung greift stark in den Zellzyklus und Zellmetabolismus ein und aktiviert verschiedene Signalwege, welche die Wirkung einer vorherigen IGF-1-Stimulation überlagern. Es ist anzunehmen, dass die Regenerationsphase, welche Zellen nach einer Kryokonservierung durchlaufen, Grund für das deutlich schlechtere Vaskularisierungspotential von IGF-1-stimulierten und anschließend kryokonservierten Gefäßfragmenten im Vergleich zu IGF-1-stimulierten, nicht-kryokonservierten Fragmenten ist. Des Weiteren ist es denkbar, dass auch das eingesetzte Kryoprotektivum negative Auswirkungen auf das Vaskularisierungspotential der Gefäßfragmente hat.

### *7.2.2.1 Klinische Perspektiven*

Mikrovaskuläre Fragmente können aus Fettgewebe isoliert und kryokonserviert werden. Dies bietet die Option, sie zu einem späteren Zeitpunkt als Vaskularisierungseinheiten von Gewebekonstrukten einzusetzen [LASCHKE et al., 2018]. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass sich die Kryokonservierung nicht dazu eignet, um eine pro-angiogene Aktivierung von IGF-1-stimulierten Gefäßfragmenten langfristig zu erhalten.

Trotz vieler Vorteile muss bei einer Kryokonservierung immer mit einem Verlust an biologischem Material und einer erhöhten Apoptoserate von Zellen in den primären

Tagen nach der Auftauphase gerechnet werden [BAUST et al., 2004; WHALEY et al., 2021]. Zudem benötigen kryokonservierte Zellen mitunter mehrere Stunden bis Tage, um sich an die veränderten Umgebungsbedingungen anzupassen [BAHSOUN et al., 2020]. Ein Ansatz wäre das Verfahren der Kryokonservierung zu optimieren, um später einen größeren Zellertrag und eine höhere Zellviabilität zu erreichen. Die stimulatorischen und anti-apoptotischen Eigenschaften von IGF-1 könnten dabei während der Kryokonservierung genutzt werden. Mehrere Studien belegen eine erhöhte Kryotoleranz von Spermien und Embryonen, die während des Biobankings in IGF-1-supplementiertem Medium konserviert wurden [KOCYIGIT, 2015; SELVARAJU et al., 2016]. Darüber hinaus stärkt IGF-1 unter ischämischen Zuständen, wie sie auch bei einer Kryokonservierung auftreten, Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen und wirkt somit stabilisierend auf Blutgefäße [BAKE et al., 2019]. Diese Effekte könnten in künftigen klinischen Szenarien bei der Langzeit-Lagerung von mikrovaskulären Fragmenten, aber auch von größeren autologen Gefäßtransplantaten, wie beispielsweise für Bypass-Operationen, von Vorteil sein.

Eine weitere interessante Fragestellung wäre, ob die Kryokonservierung von Fettgewebe in IGF-1-supplementiertem Medium zu einer verbesserten Angiogenese und Zellviabilität führt. Klinisch könnte das Verfahren bei der autologen Fetttransplantation genutzt werden. Nach einer autologen Fetttransplantation oder auch *Lipofilling* muss mit einer teilweisen Resorption des injizierten Fettgewebes gerechnet werden [SIMONACCI et al., 2017]. Aus diesem Grund wird in vielen Fällen eine leichte Überkorrektur durchgeführt bzw. bei größeren Volumendefiziten ein mehrzeitiges Vorgehen favorisiert. Verschiedene klinische Studien belegen den erfolgreichen Einsatz von kryokonserviertem Fettgewebe [BUTTERWICK et al., 2006; MA et al., 2018]. Dabei wurde überschüssiges gewonnenes Fettgewebe kryokonserviert und in einem Zweiteingriff für die Auffüllung von abgebautem Gewebavolumen verwendet. Die positiven Effekte von IGF-1 während einer Kryokonservierung könnten zusätzlich einem postoperativen Volumenschwund entgegenwirken und zu einem besseren operativen Ergebnis beitragen.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **AGRAWAL CM, RAY RB** (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 55: 141-150
2. **AL-FAGEEH MB, SMALES CM** (2006) Control and regulation of the cellular responses to cold shock: The responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J* 397: 247
3. **ALGIRE GH** (1943) An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11
4. **ALTAN S, SAĞSÖZ H, OĞURTAN Z** (2017) Topical dimethyl sulfoxide inhibits corneal neovascularization and stimulates corneal repair in rabbits following acid burn. *Biotech Histochem* 92: 619-636
5. **ANDERSON SM, SIEGMAN SN, SEGURA T** (2011) The effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) presentation within fibrin matrices on endothelial cell branching. *Biomaterials* 32: 7432-7443
6. **ANTEBI B, ASHER AM, RODRIGUEZ LA, MOORE RK, MOHAMMADIPOOR A, CANCIO LC** (2019) Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *J Transl Med* 17: 1-13
7. **AVWIORO G** (2011) Histochemical uses of haematoxylin - a review. *Int J Resh and Rev Appl Sci* 1: 24-34
8. **BAE H, PURANIK AS, GAUVIN R, EDALAT F, CARRILLO-CONDE B, PEPPAS NA, KHADEMOSSEINI A** (2012) Building vascular networks. *Sci Transl Med* 4: 160ps23
9. **BAEYENS N** (2018) Fluid shear stress sensing in vascular homeostasis and remodeling: Towards the development of innovative pharmacological approaches to treat vascular dysfunction. *Biochem Pharmacol* 158: 185-191
10. **BAHSOUN S, COOPMAN K, AKAM EC** (2020) Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther* 11: 1-15
11. **BAINO F, HAMZEHLU S, KARGOZAR S** (2018) Bioactive glasses: Where are we and where are we going? *J Funct Biomater* 9: 25
12. **BAKE S, OKOREEH A, KHOSRAVIAN H, SOHRABJI F** (2019) Insulin-like growth factor (IGF)-1 treatment stabilizes the microvascular cytoskeleton under ischemic conditions. *Exp Neurol* 311: 162
13. **BAUST JM, VAN BUSKIRK RG, BAUST JG** (2004) Gene activation of the apoptotic caspase cascade following cryogenic storage. *Cell Preserv Technol* 1: 63-80

14. **BERTASSONI LE, CECCONI M, MANOHARAN V, NIKKHAH M, HJORTNAES J, CRISTINO AL, BARABASCHI G, DEMARCHI D, DOKMECI MR, YANG Y, KHADEMOSSEINI A** (2014) Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip* 14: 2202-2211
15. **BERTHIAUME F, MAGUIRE TJ, YARMUSH ML** (2011) Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2: 403-430
16. **BEST BP** (2015) Cryoprotectant toxicity: Facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res* 18: 422-436
17. **BIDLINGMAIER M, FRIEDRICH N, EMENY RT, SPRANGER J, WOLTERS OD, ROSWALL J, KÖRNER A, OBERMAYER-PIETSCH B, HÜBENER C, DAHLGREN J, FRYSTYK J, PFEIFFER AFH, DOERING A, BIELOHUBY M, WALLASCHOFSKI H, ARAFAT AM** (2014) Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (IGF-I) from birth to senescence: Results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *J Clin Endocrinol Metab* 99: 1712-1721
18. **BIRBRAIR A** (2018) Pericyte biology: Development, homeostasis, and disease. *Adv Exp Med Biol* 1109: 1-3
19. **BOLDOCK L, WITTKOWSKA C, PERRAULT CM** (2017) Microfluidic traction force microscopy to study mechanotransduction in angiogenesis. *Microcirculation* 24: E12361
20. **BORINI A, BIANCHI V** (2010) Cryopreservation of mature and immature oocytes. *Clin Obstet Gynecol* 53: 763-774
21. **BOUCHER J, TSENG YH, KAHN CR** (2010) Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J Biol Chem* 285: 17235-17245
22. **BRÅKENHJELM E, CAO R, GAO B, ANGELIN B, CANNON B, PARINI P, CAO Y** (2004) Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet induced and genetic obesity in mice. *Circ Res* 94: 1579-1588
23. **BRITTBERG M, LINDAHL A, NILSSON A, OHLSSON C, ISAKSSON O, PETERSON L** (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895
24. **BRYDA EC** (2013) The mighty mouse: The impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med* 110: 207-211
25. **BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X, WANG X** (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290
26. **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

- 
27. **BURNETTE WN** (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203
  28. **BURTCH SR, SAMETI M, OLMSTEAD RT, BASHUR CA** (2018) Rapid generation of three-dimensional microchannels for vascularization using a subtractive printing technique. *J Biophotonics* 11: e201700226
  29. **BUTTERWICK KJ, BEVIN AA, IYER S** (2006) Fat transplantation using fresh versus frozen fat: A side-by-side two-hand comparison pilot study. *Dermatol Surg* 32: 640-644
  30. **CAO Y** (2013) Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 18: 478-489
  31. **CARDON SZ, OESTERMEYER CF, BLOCH EH** (1970) Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2: 67-76
  32. **CARMELIET P** (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395
  33. **CERRAI P, GUERRA GD, TRICOLI M, KRAJEWSKI A, RAVAGLIOLI A, MARTINETTI R, DOLCINI L, FINI M, SCARANO A, PIATTELLI A** (1999) Periodontal membranes from composites of hydroxyapatite and bioresorbable block copolymers. *J Mater Sci Mater Med* 10: 677-682
  34. **CHANDRASEKHAR G, SAILAJA D** (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)/Akt but not PI-3K/p70 S6 kinase signaling mediates IGF-1-promoted lens epithelial cell survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3577-3588
  35. **CHANG HR, KIM HJ, XU X, FERRANTE AW JR** (2016) Macrophage and adipocyte IGF1 maintain adipose tissue homeostasis during metabolic stresses. *Obesity (Silver Spring)* 24: 172-183
  36. **CHINNADURAI R, GARCIA MA, SAKURAI Y, LAM WA, KIRK AD, GALIPEAU J, COPLAND IB** (2014) Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Reports* 3: 60-72
  37. **CHISALITA SI, ARNQVIST HJ** (2004) Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: 896-901
  38. **CHOI M, KWOK SJJ, YUN SH** (2015) In vivo fluorescence microscopy: Lessons from observing cell behavior in their native environment. *Physiology (Bethesda)* 30: 40-49
  39. **CHOUDHERY MS, HARRIS DT** (2014) Cryopreservation can be used as an anti-aging strategy. *Cytotherapy* 16: 1771-1773
  40. **CLEMMONS DR** (2012) Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41: 425-443

41. **CRANDALL DL, HAUSMAN GJ, KRAL JG** (1997) A review of the microcirculation of adipose tissue: Anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4: 211-232
42. **DANTZER E, QUERUEL P, SALINIER L, PALMIER B, QUINOT JF** (2001) Integra, a new surgical alternative for the treatment of massive burns. Clinical evaluation of acute and reconstructive surgery: 39 cases. *Ann Chir Plast Esthet* 46: 173-189
43. **DAYAN D, HISS Y, HIRSHBERG A, BUBIS JJ, WOLMAN M** (1989) Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93: 27-29
44. **DEBEFVE E, CHENG C, SCHAEFER SC, YAN H, BALLINI JP, VAN DEN BERGH H, LEHR HA, RUFFIEUX C, RIS HB, KRUEGER T** (2010) Photodynamic therapy induces selective extravasation of macromolecules: Insights using intravital microscopy. *J Photochem Photobiol B: Biol* 98: 69-76
45. **DEBERGH I, VAN DAMME N, PATTYN P, PEETERS M, CEELEN WP** (2010) The low-molecular-weight heparin, nadroparin, inhibits tumour angiogenesis in a rodent dorsal skinfold chamber model. *Br J Cancer* 102: 837-843
46. **DELAFONTAINE P, SONG YH, LI Y** (2004) Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 435-444
47. **DEMEESTERE I, SIMON P, DEDEKEN L, MOFFA F, TSÉPÉLIDIS S, BRACHET C, DELBAERE A, DEVREKER F, FERSTER A** (2015) Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod* 30: 2107-2109
48. **DEVINE RD, SEKHRI P, BEHBEHANI GK** (2018) Effect of storage time and temperature on cell cycle analysis by mass cytometry. *Cytometry A* 93: 1141-1149
49. **DOBRUCKI LW, TSUTSUMI Y, KALINOWSKI L, DEAN J, GAVIN M, SEN S, MENDIZABAL M, SINUSAS AJ, AIKAWA R** (2010) Analysis of angiogenesis induced by local IGF-1 expression after myocardial infarction using microSPECT-CT imaging. *J Mol Cell Cardiol* 48: 1071-1079
50. **DONNDORF P, LUDWIG M, WILDSCHÜTZ F, USEINI D, KAMINSKI A, VOLLMAR B, STEINHOFF G** (2013) Intravital microscopy of the microcirculation in the mouse cremaster muscle for the analysis of peripheral stem cell migration. *J Vis Exp* 81: e50485
51. **DOORNAERT M, COLLE J, DE MAERE E, DECLERCQ H, BLONDEEL P** (2019) Autologous fat grafting: Latest insights. *Ann Med Surg (Lond)* 37: 47-53
52. **DRABEK T, TISHERMAN SA, BEUKE L, STEZOSKI J, JANESKO-FELDMAN K, LAHOUD-RAHME M, KOCHANÉK PM** (2009) Deep hypothermia attenuates microglial proliferation independent of neuronal death after prolonged cardiac arrest in rats. *Anesth Analg* 109: 914-923

53. **DRESIOS J, ASCHRAFI A, OWENS GC, VANDERKLISH PW, EDELMAN GM, MAURO VP** (2005) Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1865-1870
54. **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
55. **DUPONT J, KHAN J, QU BH, METZLER P, HELMAN L, LeROITH D** (2001) Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: Identification by cDNA microarray analysis. *Endocrinology* 142: 4969-4975
56. **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: 49-65
57. **EFSTATHOPOULOS EP, PATATOUKAS G, PANTOS I, BENEKOS O, KATRITSIS D, KELEKIS NL** (2008) Wall shear stress calculation in ascending aorta using phase contrast magnetic resonance imaging. Investigating effective ways to calculate it in clinical practice. *Phys Med* 24: 175-181
58. **EL-KASSABY AW, RETIK AB, YOO JJ, ATALA A** (2003) Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol* 169: 170-173
59. **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
60. **EROL O, SPIRA M** (1980) New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surg Forum* 66: 109-115
61. **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
62. **FOULSTONE E, PRINCE S, ZACCHEO O, BURNS JL, HARPER J, JACOBS C, CHURCH D, HASSAN AB** (2005) Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 205: 145-153
63. **FRANÇOIS M, COPLAND IB, YUAN S, ROMIEU-MOUREZ R, WALLER EK, GALIPEAU J** (2012) Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- $\gamma$  licensing. *Cytotherapy* 14: 147-152
64. **FRIESENECKER B, TSAI AG, INTAGLIETTA M** (1994) Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: 2204-2212
65. **FRUEH FS, SPÄTER T, LINDENBLATT N, CALCAGNI M, GIOVANOLI P, SCHEUER C, MENDER MD, LASCHKE MW** (2017a) Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes. *J Invest Dermatol* 137: 217-227

66. **FRUEH FS, SPÄTER T, SCHEUER C, MENDER MD, LASCHKE MW** (2017b) Isolation of murine adipose tissue-derived microvascular fragments as vascularization units for tissue engineering. *J Vis Exp* 122: e55721
67. **FUJITA J** (1999) Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 243-255
68. **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
69. **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
70. **GALLICO GG, O'CONNOR NE, COMPTON CC, KEHINDE O, GREEN H** (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311: 448-451
71. **GAWLOWSKI DM, HARDING NR, GRANGER HJ** (1989) Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37: 1-15
72. **GEALEKMAN O, GURAV K, CHOUINARD M, STRAUBHAAR J, THOMPSON M, MALKANI S, HARTIGAN C, CORVERA S** (2014) Control of adipose tissue expandability in response to high fat diet by the insulin-like growth factor-binding protein-4. *J Biol Chem* 289: 18327-18338
73. **GEHMERT S, SADAT S, SONG YH, YAN Y, ALT E** (2008) The anti-apoptotic effect of IGF-1 on tissue resident stem cells is mediated via PI3-kinase dependent secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) release. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 752-755
74. **GERDES J** (1990) Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1: 199-206
75. **GHANAATI S, WEBBER MJ, UNGER RE, ORTH C, HULVAT JF, KIEHNA SE, BARBECK M, RASIC A, STUPP SI, KIRKPATRICK CJ** (2009) Dynamic in vivo biocompatibility of angiogenic peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 30: 6202-6212
76. **GOOSSENS E, VAN SAEN D, TOURNAYE H** (2013) Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: From research to clinic. *Hum Reprod* 28: 897-907
77. **GREGOIRE FM, SMAS CM, SUL HS** (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809
78. **GRIFFETH RJ, BIANDA V, NEF S** (2014) The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic Clin Androl* 24: 1-10
79. **GUAN J, STANKUS JJ, WAGNER WR** (2007) Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *J Control Release* 120: 70-78



80. **HAACK-SØRENSEN M, BINDSLEV L, MORTENSEN S, FRIIS T, KASTRUP J** (2007) The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. *Cytotherapy* 9: 328-337
81. **HALBERG N, KHAN T, TRUJILLO ME, WERNSTEDT-ASTERHOLM I, ATTIE AD, SHERWANI S, WANG ZV, LANDSKRONER-EIGER S, DINEEN S, MAGALANG UJ, BREKKEN RA, SCHERER PE** (2009) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29: 4467-4483
82. **HALMY C, NÁDAI Z, TAMÁS G, KASSAI T, TAMÁS R** (2012) The role of Integra dermal regeneration matrix in skin replacement on the upper extremity. *Orv Hetil* 153: 1351-1355
83. **HAN RN, POST M, TANSWELL AK, LYE SJ** (2003) Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 159-169
84. **HAO CN, GENG Y, LI F, YANG T, SU DF, DUAN JL, LI Y** (2011) Insulin-like growth factor-1 receptor activation prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Apoptosis* 16: 1118-1127
85. **HARDER Y, SCHMAUSS D, WETTSTEIN R, EGAÑA JT, WEISS F, WEINZIERL A, SCHULDT A, MACHENS HG, MENDER MD, REZAEIAN F** (2014) Ischemic tissue injury in the dorsal skinfold chamber of the mouse: A skin flap model to investigate acute persistent ischemia. *J Vis Exp* 93: e51900
86. **HARRINGTON EA, BENNETT MR, FANIDI A, EVAN GI** (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 13: 3286-3295
87. **HERRMANN KS** (1983) Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249
88. **HIGASHI Y, SUKHANOV S, SHAI SY, DANCHUK S, TANG R, SNARSKI P, LI Z, LOBELLE-RICH P, WANG M, WANG D, YU H, KORTHUIS R, DELAFONTAINE P** (2016) Insulin-like growth factor 1 receptor deficiency in macrophages accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in apolipoprotein E deficient mice. *Circulation* 133: 2263-2278
89. **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
90. **HODDE J** (2002) Review: Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng* 8: 295-308
91. **HOFFMANN JN, VOLLMAR B, INTHORN D, SCHILDBERG FW, MENDER MD** (1999) A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock* 12: 355-364
92. **HOLT R, SØNKSEN PH** (2008) Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *Br J Pharmacol* 154: 542-556

93. **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
94. **HSIEH T, GORDON RE, CLEMMONS DR, BUSBY WH, DUAN C** (2003) Regulation of vascular smooth muscle cell responses to insulin-like growth factor (IGF)-I by local IGF-binding proteins. *J Biol Chem* 278: 42886-42892
95. **HUCH A, HUCH R** (1976) Transcutaneous, noninvasive monitoring of pO<sub>2</sub>. *Hosp Pract* 11: 43-52
96. **IKADA Y** (2006) Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 3: 589-601
97. **IWATANI M, IKEGAMI K, KREMENSKA Y, HATTORI N, TANAKA S, YAGI S, SHIOTA K** (2006) Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24: 2549-2556
98. **JACOBO SMP, KAZLAUSKAS A** (2015) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) stabilizes nascent blood vessels. *J Biol Chem* 290: 6349-6360
99. **JAIN RK, MUNN LL, FUKUMURA D** (2002) Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer* 2: 266-276
100. **JAIN RK, AU P, TAM J, DUDA DG, FUKUMURA D** (2005) Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* 23: 821-823
101. **JANG TH, PARK SC, YANG JH, KIM JY, SEOK JH, PARK US, CHOI CW, LEE SR, HAN J** (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 6: 12-18
102. **JUMABAY M, ABDMAULEN R, URS S, HEYDARKHAN-HAGVALL S, CHAZENBALK GD, JORDAN MC, ROOS KP, YAO Y, BOSTRÖM KI** (2012) Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 53: 790-800
103. **JUNQUEIRA LC, COSSERMELLI W, BRENTANI R** (1978) Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 41: 267-274
104. **JUNQUIERA LC, BRENTANI RR** (1979) A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem* 94: 96-99
105. **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
106. **KAMLER M, JAKOB H, LEHR HA, GEBHARD MM, HAGL S** (1997) Direct visualization of leukocyte/endothelial cell interaction during extracorporeal circulation (ECC) in a new animal model. *Eur J Cardiothorac Surg* 11: 973-980
107. **KANE LP, SHAPIRO VS, STOKOE D, WEISS A** (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9: 601-604

108. **KARLSSON JO, TONER M** (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. *Biomaterials* 17: 243-256
109. **KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEB A, SPÄTER T, MENDER MD, LASCHKE MW** (2018) Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 35: 268-280
110. **KIRILLOVA A, YEAZEL TR, ASHEGHALI D, PETERSEN SR, DORT S, GALL K, BECKER ML** (2021) Fabrication of biomedical scaffolds using biodegradable polymers. *Chem Rev* 121: 11238-11304
111. **KLYSCZ T, JÜNGER M, JUNG F, ZEINTL H** (1997) Cap image - a newly-developed computer-aided video frame analysis system for dynamic capillaroscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175
112. **KOCYIGIT A, CEVIK M** (2015) Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology* 71: 64-69
113. **KOIZUMI K, TSUTSUMI Y, YOSHIOKA Y, WATANABE M, OKAMOTO T, MUKAI Y, NAKAGAWA S, MAYUMI T** (2003) Anti-angiogenic effects of dimethyl sulfoxide on endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 26: 1295-1298
114. **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
115. **KONDO T, VICENT D, SUZUMA K, YANAGISAWA M, KING GL, HOLZENBERGER M, KAHN CR** (2003) Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest* 111: 1835-1842
116. **KOSTALLARI E, BABA AY, ALONSO MS, NGOH P, RELAX F, LAFUSTE P, GHERARDI RK** (2015) Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. *Development* 142: 1242-1253
117. **KOTOBUKI N, HIROSE M, MACHIDA H, KATOU Y, MURAKI K, TAKAKURA Y, OHGUSHI H** (2005) Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 11: 663-673
118. **KUHNLE GEH, LEIPFINGER FH, GOETZ AE** (1993) Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 74: 1462-1471
119. **LAEMMLI UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
120. **LANGE K, BOYD LJ** (1942) The use of fluorescein to determine the adequacy of the circulation. *Med Clin N* 26: 943-952

121. **LANGER R, VACANTI JP** (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926
122. **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
123. **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, MENDER MD** (2006) Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104
124. **LASCHKE MW, MENDER MD** (2007) In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13: 331-342
125. **LASCHKE MW, RÜCKER M, JENSEN G, CARVALHO C, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENDER 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
126. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENDER MD** (2009) Inosculation: Connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-465
127. **LASCHKE MW, MUSSAWY H, SCHULER S, KAZAKOV A, RÜCKER M, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD** (2011a) Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue Eng Part A* 17: 841-853
128. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENDER MD** (2011b) The dorsal skinfold chamber: Window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22: 147-167
129. **LASCHKE MW, MENDER MD** (2012) Vascularization in tissue engineering: Angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48: 85-92
130. **LASCHKE MW, KLEER S, SCHEUER C, SCHULER S, GARCIA P, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD** (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24: 266-277
131. **LASCHKE MW, VORSTERMAN VAN OIJEN AE, KÖRBEL C, SCHEUER C, MENDER MICHAEL D** (2013) 4-Hydroxybenzyl alcohol: A novel inhibitor of tumor angiogenesis and growth. *Life Sci* 93: 44-50
132. **LASCHKE MW, GRÄSSER C, KLEER S, SCHEUER C, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD** (2014) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater* 28: 287-298
133. **LASCHKE MW, MENDER MD** (2016a) Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol Adv* 34: 112-121

134. **LASCHKE MW, MENDER MD** (2016b) The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater* 32: 202-215
135. **LASCHKE MW, KARSCHNIA P, SCHEUER C, HEß A, METZGER W, MENDER MD** (2018) Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 12: 1020-1030
136. **LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, KARSCHNIA P, MENDER MD** (2019a) Subnormothermic short-term cultivation improves the vascularization capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 13: 131-142
137. **LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, KARSCHNIA P, KONTAXI E, MENDER MD** (2019b) University of Wisconsin solution for the xeno-free storage of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Regen Med* 14: 681-691
138. **LASCHKE MW, SPÄTER T, MENDER MD** (2021) Microvascular fragments: More than just natural vascularization units. *Trends Biotechnol* 39: 24-33
139. **LAVIOLA L, NATALICCHIO A, GIORGINO F** (2007) The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 13: 663-669
140. **LEE KS, LIM BV, JANG MH, SHIN MC, LEE TH, KIM YP, SHIN HS, CHO SY, KIM H, SHIN MS, KIM EH, KIM CJ** (2002) Hypothermia inhibits cell proliferation and nitric oxide synthase expression in rats. *Neurosci Lett* 329: 53-56
141. **LEHLE K, HOENICKA M, JACOBS VR, SCHMID FX, BIRNBAUM DE** (2005) Cryopreservation of human endothelial cells for vascular tissue engineering. *Cryobiology* 50: 154-161
142. **LEHR HA, LEUNIG M, MENDER MD, NOLTE D, MESSMER K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062
143. **LEHR HA, VOLLMAR B, VAJKOCZY P, MENDER MD** (1999) Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Meth Enzymol* 300: 462-481
144. **LEMOINE AY, LEDOUX S, LARGER E** (2013) Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb Haemost* 110: 661-669
145. **LEUNIG M, YUAN F, MENDER MD, BOUCHER Y, GOETZ AE, MESSMER K, JAIN RK** (1992) Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID Mice. *Cancer Res* 52: 6553-6560
146. **LI B, DAVIDSON JM, GUELCHER SA** (2009) The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin excisional wounds. *Biomaterials* 30: 3486-3494

147. **LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X** (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489
148. **LI Y, HIGASHI Y, ITABE H, SONG YH, DU J, DELAFONTAINE P** (2003) Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2178-2184
149. **LIN S, ZHANG Q, SHAO X, ZHANG T, XUE C, SHI S, ZHAO D, LIN Y** (2017) IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell Prolif* 50: e12390
150. **LINDHORST D, TAVASSOL F, VON SEE C, SCHUMANN P, LASCHKE MW, HARDER Y, BORMANN KH, ESSIG H, KOKEMÜLLER H, KAMPMANN A, VOSS A, MÜLHAUPT R, MENDER MD, GELLRICH NC, RÜCKER M** (2010) Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. *J Biomed Mater Res* 95: 783-792
151. **LIU J, LIU C, SUN B, SHI C, QIAO C, KE X, LIU S, LIU X, SUN H** (2013) Differentiation of rabbit bone mesenchymal stem cells into endothelial cells in vitro and promotion of defective bone regeneration in vivo. *Cell Biochem Biophys* 68: 479-487
152. **LIU W, LIU Y, LOWE WL** (2001) The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology* 142: 1710-1719
153. **LOPEZ-LOPEZ C, LEROITH D, TORRES-ALEMAN I** (2004) Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9833-9838
154. **LOVELOCK JE, BISHOP MW** (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183: 1394-1395
155. **LOWRY OH, ROOSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
156. **MA H, FANG YH, LIN CH, PERNG CK, TSAI CH, HSIAO FY** (2018) Facial recontouring with autologous cryopreserved fat graft. *Formos J Surg* 51: 58
157. **MACCHIARINI P, JUNGEBLUTH P, GO T, ASNAGHI MA, REES LE, COGAN TA, DODSON A, MARTORELL J, BELLINI S, PARNIGOTTO PP, DICKINSON SC, HOLLANDER AP, MANTERO S, CONCONI MT, BIRCHALL MA** (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372: 2023-2030
158. **MAIRET-COELLO G, TURRY A, DICICCO-BLOOM E** (2009) Insulin-like growth factor-1 promotes g1/s cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J Neurosci* 29: 775

- 
159. **MANDUMPAL JB, KRECK CA, MANCERA RL** (2011) A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Phys Chem Chem Phys* 13: 3839-3842
160. **MANO JF, SILVA GA, AZEVEDO HS, MALAFAYA PB, SOUSA RA, SILVA SS, BOESEL LF, OLIVEIRA JM, SANTOS TC, MARQUES AP, NEVES NM, REIS RL** (2007) Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends. *J R Soc Interface* 4: 999-1030
161. **MATIJASEVIC Z, SNYDER JE, LUDLUM DB** (1998) Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol Res* 10: 605-610
162. **MAYO LD, DONNER DB** (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11598-11603
163. **MAZUR P** (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47: 347-369
164. **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
165. **MENDES JMF, VALVERDE LF, VIDAL MTA, PAREDES BD, COELHO P, ALLAHDADI KJ, COLETTA RD, SOUZA BSF, ROCHA CAG** (2020) Effects of IGF-1 on proliferation, angiogenesis, tumor stem cell populations and activation of AKT and hedgehog pathways in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 21: 1-20
166. **MENGER MD, HAMMERSEN F, MESSMER K** (1992a) In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40: 19-25
167. **MENGER MD, PATTENIER J, WOLF B, JÄGER S, FEIFEL G, MESSMER K** (1992b) Cryopreservation of islets of Langerhans does not affect angiogenesis and revascularization after free transplantation. *Eur Surg Res* 24: 89-96
168. **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
169. **MICHAELI D, MCPHERSON M** (1990) Immunologic study of artificial skin used in the treatment of thermal injuries. *J Burn Care Rehabil* 11: 21-26
170. **MOIEMEN NS, VLACHOU E, STAIANO JJ, THAWY Y, FRAME JD** (2006) Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: Histologic study, clinical evaluation, and current practice. *Plast Reconstr Surg* 117: 160-174
171. **MORENO MJ, BALL M, ANDRADE MF, MCDERMID A, STANIMIROVIC DB** (2006) Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) is a novel anti-angiogenic and anti-tumorigenic mediator secreted by dibutyryl cyclic AMP (dB-cAMP)-differentiated glioblastoma cells. *Glia* 53: 845-857

172. **MÜLLER-SCHWEINITZER E** (2009) Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis* 5: 97-104
173. **MUNDER MC, MIDTVEDT D, FRANZMANN T, NÜSKE E, OTTO O, HERBIG M, ULBRICHT E, MÜLLER P, TAUBENBERGER A, MAHARANA S, MALINOVSKA L, RICHTER D, GUCK J, ZABURDAEV V, ALBERTI S** (2016) A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy. *eLife* 5: e09347
174. **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
175. **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
176. **NENICU A, KÖRBEL C, GU Y, MENDER MD, LASCHKE MW** (2014) Combined blockade of angiotensin II type 1 receptor and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  by telmisartan effectively inhibits vascularization and growth of murine endometriosis-like lesions. *Hum Reprod* 29: 1011-1024
177. **NICOSIA RF, NICOSIA SV, SMITH M** (1994) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 145: 1023-1029
178. **NIKURA T, HASHIMOTO Y, OKAMOTO T, ABE Y, YASUKAWA T, KAWASUMI M, HIRAKI T, KITA Y, TERASHITA K, KOUYAMA K, NISHIMOTO I** (2001) Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by Alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an IGF-binding protein-sensitive manner. *J Neurosci* 21: 1902-1910
179. **ÖBERG PA** (1990) Laser-Doppler flowmetry. *Crit Rev Biomed Eng* 18: 125-161
180. **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
181. **ORR AW, ELZIE CA, KUCIK DF, MURPHY-ULLRICH JE** (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917-2927
182. **ORTH M, ALTMAYER MAB, SCHEUER C, BRAUN BJ, HOLSTEIN JH, EGLIN D, D'ESTE M, HISTING T, LASCHKE MW, POHLEMANN T, MENDER MD** (2018) Effects of locally applied adipose tissue-derived microvascular fragments by thermoresponsive hydrogel on bone healing. *Acta Biomater* 77: 201-211
183. **PALACIOS R** (2002) The future of global ageing. *Int J Epidemiol* 31: 786-791
184. **PALANISAMY KARTHIKKA, NARESHKUMAR RAGAVACHETTY NAGARAJ, SIVAGURUNATHAN SUGANYA, RAMAN RAJIV, SULOCHANA KONERIRAJAPURAM NATARAJAN, CHIDAMBARAM SUBBULAKSHMI** (2019) Anti-angiogenic effect of adiponectin in human primary microvascular and macrovascular endothelial cells. *Microvasc Res* 122: 136-145



- 
185. **PAPENFUSS HD, GROSS J F, INTAGLIETTA M, TREESE FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318
186. **PARK HY, KWON HM, LIM HJ, HONG BK, LEE JY, PARK BE, JANG Y, CHO SY, KIM HS** (2001) Potential role of leptin in angiogenesis: Leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33: 95-102
187. **PÁRRIZAS M, SALTIEL AR, LEROITH D** (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272: 154-161
188. **PEGG DE** (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 20: 5-13
189. **PEGG DE** (2007) Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 368: 39-57
190. **PENNING LC, DUBBELMAN TMAR** (1994) Fundamentals of photodynamic therapy: Cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 5: 139-146
191. **PERETS A, BARUCH Y, WEISBUCH F, SHOSHANY G, NEUFELD G, COHEN S** (2003) Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 65: 489-497
192. **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: 11-24
193. **PINA S, RIBEIRO VP, MARQUES CF, MAIA FR, SILVA TH, REIS RL, OLIVEIRA JM** (2019) Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Materials (Basel)* 12: 1824
194. **POLLAK MN, SCHERNHAMMER ES, HANKINSON SE** (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4: 505-518
195. **POVLISHOCK JT, ROSENBLUM WI, SHOLLEY MM, WEI EP** (1983) An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 110: 148-160
196. **PRIES AR** (1988) A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327-345
197. **PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS** (1973) Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol* 150: 174-187
198. **RABINOVSKY ED, DRAGHIA-AKLI R** (2004) Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol Ther* 9: 46-55

- 
199. **RANKE MB** (2015) Treatment with recombinant human insulin-like growth factor-1 in severe primary IGF deficiency and beyond. *Horm Res Paediatr* 83: 358-360
200. **REED JC** (1997) Cytochrome c: Can't live with it - can't live without it. *Cell* 91: 559-562
201. **REED MWR, MILLER FN** (1988) Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36: 104-107
202. **RIEDER CL, COLE RW** (2002) Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 1: 169-175
203. **RINDERKNECHT E, HUMBEL RE** (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
204. **RISAU W** (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
205. **ROOBOL A, CARDEN MJ, NEWSAM RJ, SMALES CM** (2009) Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming. *FEBS J* 276: 286-302
206. **ROSENBLUM WI** (1978) Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 15: 103-106
207. **ROSS RS, UEDA K, LICHTLEN PR, REES JR** (1964) Measurement of myocardial blood flow in animals and man by selective. *Circ Res* 15: 28-41
208. **RÜCKER M, LASCHKE MW, JUNKER D, CARVALHO C, SCHRAMM A, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENDER MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038
209. **SABATER AL, ANDREU EJ, GARCÍA-GUZMÁN M, LÓPEZ T, ABIZANDA G, PEREZ VL, MORENO-MONTAÑÉS J, PRÓSPER F** (2017) Combined PI3K/Akt and Smad2 activation promotes corneal endothelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58: 745-754
210. **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
211. **SANDISON JC** (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28: 281-287
212. **SCAVO LM, KARAS M, MURRAY M, LEROITH D** (2004) Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3543-3553

213. **SCHMIDT VJ, HILGERT JG, COVI JM, LEIBIG N, WIETBROCK JO, ARKUDAS A, POLYKANDRIOTIS E, DE WIT C, HORCH RE, KNESER U** (2015) Flow increase is decisive to initiate angiogenesis in veins exposed to altered hemodynamics. *PLoS One* 10: e0117407
214. **SCHMITZ S** (2011) Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen. *Der Experimentator: Zellkultur* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 191-204
215. **SCHREITER J, MEYER S, SCHMIDT C, SCHULZ RM, LANGER S** (2017) Dorsal skinfold chamber models in mice. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW* 6: 1-8
216. **SELVARAJU S, KRISHNAN BB, ARCHANA SS, RAVINDRA JP** (2016) IGF1 stabilizes sperm membrane proteins to reduce cryoinjury and maintain post-thaw sperm motility in buffalo (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cryobiology* 73: 55-62
217. **SETAYESHMEHR M, ESFANDIARI E, RAFIEINIA M, HASHEMIBENI B, TAHERI-KAFRANI A, SAMADIKUCHAKSARAEI A, KAPLAN DL, MORONI L, JOGHATAEI MT** (2019) Hybrid and composite scaffolds based on extracellular matrices for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 25: 202-224
218. **SHEPHERD BR, CHEN HYS, 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
219. **SHEPHERD BR, HOYING JB, WILLIAMS SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng* 13: 2871-2879
220. **SHERIDAN RL, HEGARTY M, TOMPKINS RG, BURKE JF** (1994) Artificial skin in massive burns - results to ten years. *Eur J Plast Surg* 17: 91-93
221. **SHI H, HAN C, MAO Z, MA L, GAO C** (2008) Enhanced angiogenesis in porous collagen-chitosan scaffolds loaded with angiogenin. *Tissue Eng Part A* 14: 1775-1785
222. **SHIGEMATSU S, YAMAUCHI K, NAKAJIMA K, IJIMA S, AIZAWA T, HASHIZUME K** (1999) IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J* 46: 59-62
223. **SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239
224. **SIMONACCI F, BERTOZZI N, GRIECO MP, GRIGNAFFINI E, RAPOSIO E** (2017) Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting. *Ann Med Surg* 20: 49
225. **SIMPSON HL, JACKSON NC, SHOJAEI MF, JONES RH, RUSSELL JDL, SÖNKSEN PH, DUNGER DB, UMPLEBY AM** (2004) Insulin-like growth factor I has a direct effect on glucose and protein metabolism, but no effect on lipid metabolism in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 425-432

226. **SJÖGREN K, LIU JL, BLAD K, SKRTIC S, VIDAL O, WALLENIUS V, LEROITH D, TÖRNELL J, ISAKSSON OGP, JANSSON JO, OHLSSON C** (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7088-7092
227. **SMITH LEH, SHEN W, PERRUZZI C, SOKER S, KINOSE F, XU X, ROBINSON G, DRIVER S, BISCHOFF J, ZHANG B, SCHAEFFER JM, SENDER DR** (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 5: 1390-1395
228. **SPÄTER T, FRUEH FS, NICKELS RM, MENDER MD, LASCHKE MW** (2018) Prevascularization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds: Stromal vascular fraction versus adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Biol Eng* 12: 24
229. **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
230. **STUART CA, MEEHAN RT, NEALE LS, CINTRON NM, FURLANETTO RW** (1991) Insulin-like growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1117-1122
231. **SU EJ, CIOFFI CL, STEFANSSON S, MITTEREDER N, GARAY M, HRENIUK D, LIAU G** (2003) Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 284: 1429-1440
232. **SUMEN C, MEMPEL TR, MAZO IB, VON ANDRIAN UH** (2004) Intravital microscopy: Visualizing immunity in context. *Immunity* 21: 315-329
233. **SZELL AZ, BIERBAUM RC, HAZELRIGG WB, CHETKOWSKI RJ** (2013) Live births from frozen human semen stored for 40 years. *J Assist Reprod Genet* 30: 743-744
234. **TAKAHASHI T, BROSS JB, SHABER RE, WILLIAMS RJ** (1985) Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. *Cryobiology* 22: 336-350
235. **TAN S, WANG Y, DU Y, XIAO Y, ZHANG S** (2021) Injectable bone cement with magnesium-containing microspheres enhances osteogenesis via anti-inflammatory immunoregulation. *Bioact Mater* 6: 3411-3423
236. **TANG W, ZEVE D, SUH JM, BOSNAKOVSKI D, KYBA M, HAMMER RE, TALLQUIST MD, GRAFF JM** (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322: 583-586
237. **TANIGUCHI CM, EMANUELLI B, KAHN CR** (2006) Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
238. **TARUN G, AJAY B, BHAWNA K, SUNIL K, RAVI J, BIHANI SGL** (2011) Scaffold: Tissue engineering and regenerative medicine. *Int Res J Pharm* 2: 37-42

239. **THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y** (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316
240. **TSUKADA K, SUEMATSU M** (2012) Visualization and analysis of blood flow and oxygen consumption in hepatic microcirculation: Application to an acute hepatitis model. *J Vis Exp* 66: e3996
241. **VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENDER MD** (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2: 53-61
242. **VALENTINIS B, MORRIONE A, PERUZZI F, PRISCO M, REISS K, BASERGA R** (1999) Anti-apoptotic signaling of the IGF-I receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* 18: 1827-1836
243. **VERHEIJEN M, LIENHARD M, SCHROODERS Y, CLAYTON O, NUDISCHER R, BOERNO S, TIMMERMANN B, SELEVSEK N, SCHLAPBACH R, GMUENDER H, GOTTA S, GERAEDTS J, HERWIG R, KLEINJANS J, CAIMENT F** (2019) DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* 9: 1-12
244. **VON ANDRIAN UH, CHAMBERS JD, McEVOY LM, BARGATZE RF, ARFORS KE, BUTCHER EC** (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte  $\beta 2$  integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7538-7542
245. **VON BOMHARD A, ELSÄSSER A, RITSCHL LM, SCHWARZ S, ROTTER N** (2016) Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and media – vitrification versus slow freezing methods. *PLoS One* 11: e0149660
246. **WANG L, HAN Y, SHEN Y, YAN ZQ, ZHANG P, YAO QP, SHEN BR, GAO LZ, QI YX, JIANG ZL** (2014) Endothelial insulin-like growth factor-1 modulates proliferation and phenotype of smooth muscle cells induced by low shear stress. *Ann Biomed Eng* 42: 776-786
247. **WATERSTON RH, LINDBLAD-TOH K, BIRNEY E, ROGERS J, ABRIL JF, AGARWAL P, AGARWALA R, AINSCOUGH R, ALEXANDERSSON M, AN P, ANTONARAKIS SE, ATTWOOD J, BAERTSCH R, BAILEY J, BARLOW K, BECK S, BERRY E, BIRREN B, BLOOM T, BORK P, BOTCHERBY M, BRAY N, BRENT MR, BROWN DG, BROWN SD, BULT C, BURTON J, BUTLER J, CAMPBELL RD, CARNINCI P, CAWLEY S, CHIAROMONTE F, CHINWALLA AT, CHURCH DM, CLAMP M, CLEE C, COLLINS FS, COOK LL, COPLEY RR, COULSON A, COURONNE O, CUFF J, CURWEN V, CUTTS T, DALY M, DAVID R, DAVIES J, DELEHAUNTY KD, DERI J, DERMITZAKIS ET, DEWEY C, DICKENS NJ, DIEKHANS M, DODGE S, DUBCHAK I, DUNN DM, EDDY SR, ELNITSKI L, EMES RD, ESWARA P, EYRAS E, FELSENFELD A, FEWELL GA, FLICEK P, FOLEY K, FRANKEL WN, FULTON LA, FULTON RS, FUREY TS, GAGE D, GIBBS RA, GLUSMAN G, GNERRE S, GOLDMAN N, GOODSTADT L, GRAFHAM D, GRAVES TA, GREEN ED, GREGORY S, GUIGÓ R, GUYER M, HARDISON RC, HAUSSLER D, HAYASHIZAKI Y, HILLIER LW, HINRICHS A, HLAVINA W, HOLZER T, HSU F, HUA A, HUBBARD T, HUNT A, JACKSON I, JAFFE DB, JOHNSON LS, JONES M, JONES TA, JOY A, KAMAL M, KARLSSON EK, KAROLCHIK D, KASPRZYK A, KAWAI J, KEIBLER E, KELL S, KENT WJ, KIRBY A, KOLBE DL, KORF I, KUCHERLAPATI RS, KULBOKAS EJ, KULP D, LANDERS T, LEGER JP, LEONARD S, LETUNIC I, LEVINE R, LI J, LI M, LLOYD C, LUCAS S, MA B, MAGLOTT DR, MARDIS ER, MATTHEWS L, MAUCELI E, MAYER JH, MCCARTHY M, MCCOMBIE WR, McLAREN S, McLAY K, McPHERSON JD, MELDRIM J, MEREDITH B, MESIROV JP, MILLER W, MINER TL, MONGIN E, MONTGOMERY KT, MORGAN M, MOTT R, MULLIKIN JC, MUZYNY DM, NASH WE, NELSON JO, NHAN MN, NICOL R, NING Z, NUSBAUM C, O'CONNOR MJ, OKAZAKI Y, OLIVER K, OVERTON-LARTY E, PACHTER L, PARRA G, PEPIN KH, PETERSON J, PEVZNER P, PLUMB R, POHL CS, POLIAKOV A, PONCE TC,**

- PONTING CP, POTTER S, QUAIL M, REYMOND A, ROE BA, ROSKIN KM, RUBIN EM, RUST AG, SANTOS R, SAPOJNIKOV V, SCHULTZ B, SCHULTZ J, SCHWARTZ MS, SCHWARTZ S, SCOTT C, SEAMAN S, SEARLE S, SHARPE T, SHERIDAN A, SHOWNKEEN R, SIMS S, SINGER JB, SLATER G, SMIT A, SMITH DR, SPENCER B, STABENAU A, STANGE-THOMANN N, SUGNET C, SUYAMA M, TESLER G, THOMPSON J, TORRENTS D, TREVASKIS E, TROMP J, UCLA C, URETA-VIDAL A, VINSON JP, VON NIEDERHAUSERN AC, WADE CM, WALL M, WEBER RJ, WEISS RB, WENDL MC, WEST AP, WETTERSTRAND K, WHEELER R, WHELAN S, WIERZBOWSKI J, WILLEY D, WILLIAMS S, WILSON RK, WINTER E, WORLEY KC, WYMAN D, YANG S, YANG SP, ZDOBNOV EM, ZODY MC, LANDER ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562
248. WEBSTER MHC, PATTERSON J (1976) The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 29: 182-185
249. WEROHA SJ, HALUSKA P (2012) IGF system in cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41: 335
250. WHALEY D, DAMYAR K, WITEK RP, MENDOZA A, ALEXANDER M, LAKEY JRT (2021) Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant* 30: 1-12
251. WINSOR T, BENDEZU J (1964) Thermography and the peripheral circulation. *Ann N Y Acad Sci* 121: 135-156
252. WOLFE J, BRYANT G (2001) Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. *J Int Acad Refrig* 24: 438-450
253. WONG KM, MASTENBROEK S, REPPING S (2014) Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 102: 19-26
254. XU X, COWLEY S, FLAIM CJ, JAMES W, SEYMOUR L, CUI Z (2010) The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Prog* 26: 827–837
255. YI X, LIU M, LUO Q, ZHUO H, CAO H, WANG J, HAN Y (2017) Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio* 7: 485-494
256. ZAREM HA (1969) The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66: 392-397
257. ZHENG WH, KAR S, QUIRION R (2002) Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 62: 225-233
258. 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

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlich danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger und Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes und der Überlassung des spannenden Themas.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke, der durch seine hervorragende Anleitung sowie stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit trägt. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Sein persönlicher Einsatz, die Passion für die Wissenschaft und der Perfektionismus waren und sind mir ein großes Vorbild geblieben und haben meine Faszination für die wissenschaftliche Arbeit maßgeblich geprägt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Alexander Heß und Herrn Dr. Philipp Karschnia für die kompetente Einarbeitung in die Methodik bedanken. Frau Dr. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings, Frau Janine Becker und Frau Ruth Nickels danke ich herzlich für die Unterstützung bei diversen Laborarbeiten und der Anfertigung histologischer Präparate. Zudem danke ich meinen Kollegen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Anregungen.

Ein sehr persönlicher Dank gilt meiner ganzen Familie, meinem Großvater, der mir mit seinem Wissen und seinem großen Erfahrungsschatz vom Beginn bis zum Ende der Arbeit zur Seite stand. Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre Liebe und den Rückhalt bei jedem Schritt während meines Studiums und der Entstehung dieser Arbeit. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

## **10. LEBENS LAUF**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.





## 11. PUBLIKATIONEN

### 11.1 Originalarbeit aus der vorliegenden Dissertation

LASCHKE MW, **KONTAXI E**, SCHEUER C, HEß A, KARSCHNIA P, MENDER MD (2019) Insulin-like growth factor 1 stimulates the angiogenic activity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng* 10: 1-11

### 11.2 Weitere Originalarbeiten

LASCHKE MW, HEß A, SCHEUER C, KARSCHNIA P, **KONTAXI E**, MENDER MD (2019) University of Wisconsin solution for the xeno-free storage of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Regen Med* 14: 681-691

LASCHKE MW, SEIFERT MS, SCHEUER C, **KONTAXI E**, METZGER W, MENDER MD (2019) High glucose exposure promotes proliferation and in vivo network formation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 38: 188-200

### 11.3 Zitierfähige Abstracts

**KONTAXI E**, HEß A, KARSCHNIA P, SCHEUER C, MENDER 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

Vortrag in der Preisträgersitzung auf den 21. Chirurgischen Forschungstagen in Köln, 2017

**KONTAXI E**, HEß A, KARSCHNIA P, SCHEUER C, MENDER 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

Vortrag auf dem 135. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in Berlin, 2018