

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
(Direktor: Prof. Dr. A. Seekamp)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung zum Einfluss von endothelialen Vorläuferzellen mit myeloiden
Eigenschaften auf die Vaskularisierung nach subkutaner Injektion**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Thees Marten Wermann
aus Leer (Ostfriesland)

Kiel 2021

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bodo Kurz

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.09.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Überblick.....	1
1.2. Vaskularisierungsstrategien.....	2
1.3. Steuerung der Angiogenese	5
1.4. Eigenschaften der endothelialen Progenitorzellen	7
1.5. Co-Kulturen – therapeutische Optionen mit OEC, EPC und MSC.....	9
1.6. Rolle der myeloiden Zellen	12
1.7. Fragestellung der Studie.....	13
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Geräte	17
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3. Reagenzien und Lösungen	18
2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze.....	19
2.1.5. Verwendete Primär-Antikörper zur Darstellung der Angiogenese	20
2.1.6. Tiere.....	20
2.2. Methoden	20
2.2.1. Isolation und Expansion humaner endothelialer Progenitorzellen (EPC) und Outgrowth Endothelial Cells (OEC)	20
2.2.2. Isolation und Expansion mesenchymaler Stammzellen (MSC)	22
2.2.3. Vorbereitung der Zell-Matrigel-Suspension zur Injektion	23
2.2.4. Subkutane Injektion des Matrigel-Zell-Gemisches.....	24
2.2.5. Histologie und Immunhistochemie	24
2.2.6. Histomorphometrische Analyse	25
2.2.7. Statistische Analyse	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Darstellung des Einflusses der myeloiden Zellen auf die Bildung angiogener Strukturen mittels quantitativer Bildanalyse	28
3.1.1 Darstellung der Gesamtheit aller Spendersets	29
3.1.2 Spenderindividuelle Darstellung	30

3.1.2.1	Darstellung des Spendersets 1	30
3.1.2.2	Darstellung des Spendersets 2	31
3.1.2.3	Darstellung des Spendersets 4	36
3.1.2.4	Darstellung des Spendersets 5	36
3.1.2.5	Darstellung des Spendersets 6	36
4.	Diskussion	43
4.1.	Einfluss der myeloiden Zellen auf die Bildung angiogener Strukturen an der Gesamtheit aller Spender	43
4.2.	Spendervariabilität.....	45
4.3.	Rolle der EPC als myeloide Zellen	47
4.4.	Limitation des Studiendesigns	48
4.5	Fazit.....	51
5.	Zusammenfassung.....	52
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Abbildungs – und Tabellenverzeichnis	65
8.	Veröffentlichungen.....	69
9.	Danksagung.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Ang-1	Angiopoetin-1
Ang-2	Angiopoetin-2
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP-2	bone morphogenetic protein 2
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	Colony-stimulating factor 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC	endotheliale Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	endothelial cell growth medium 2
EPC	endotheliale Progenitorzellen
E-EPC	early endothelial progenitor cells, letztlich EPC
L-EPC	late endothelial progenitor cells, letztlich OEC
ET-1	Endothelin-1
FBS	fetales bovines Serum
FGF	fibroblast growth factor
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
MMP	Matrixmetalloprotease
NO	Stickstoffmonoxid
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MSC	mesenchymale Stammzellen
ODM	osteogenic differentiation medium
OEC	outgrowth endothelial cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor

SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vWF	von-Willebrand-Faktor
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

1. Einleitung

1.1. Überblick

Jedes Jahr steigt die Anzahl der orthopädischen und unfallchirurgischen Eingriffe. Allein die Zahl der implantierten neuen Gelenke an Hüfte und Knie belief sich im Jahr 2016 auf circa 440.000 (1). Zusätzlich werden laut Schätzungen knapp 30.000 Knochengewebetransplantationen pro Jahr durchgeführt (2). Selten werden hierbei ganze Knochen transplantiert, sondern häufiger individuell an ein Defizit angepasste Fragmente benötigt. Die häufigsten Gründe für eine solche Transplantation sind unter anderem Defekte durch Fehlstellungen, Frakturen, Infektionen oder Resektionen.

Obwohl Knochen ein hohes physiologisches Regenerationspotential besitzen, ist ab einer kritischen Größe des Defektes keine folgenlose Ausheilung ohne damit einhergehende Funktionseinbußen mehr möglich (3,4).

Die physiologische Frakturheilung im adulten Knochen ist maßgeblich abhängig von der Stellung der Frakturrenden zueinander. Bei einer optimalen Adaptation bildet sich Granulationsgewebe, das den Frakturspalt überbrückt. Hier entwickeln sich Osteoblasten aus osteogenen Vorläuferzellen, die letztlich Knochengewebe bilden (5). Bei einer ausbleibenden Adaptation der Frakturrenden entsteht zunächst ein bindegewebig organisiertes Hämatom im Frakturspalt. Ein Teil der frakturierten Knochenenden wird aufgrund der fehlenden Blutversorgung nekrotisch und durch Osteoklasten resorbiert. Anschließend kann bei stabilen mechanischen Verhältnissen hochwertigerer Faserknochen gebildet werden.

Herrschen stattdessen instabile Verhältnisse, entsteht bradytropher Faserknorpel, der über einen längeren Zeitraum zu Knochengewebe umgebaut wird.

Ein weit verbreitetes klinisches Problem bei der Frakturheilung ist die Bildung von Pseudarthrosen und Knochennekrosen. Diese treten vor allem dann auf, wenn durch die unzureichende Stabilisierung der Fraktur, durch eine Fraktur kritischer Größe oder durch die eingeschränkte Vaskularisierung keine ausreichende Regeneration des Knochens möglich ist (6).

Da Pseudarthrosen regelhaft mit Schmerzen und einer eingeschränkten Funktion der betroffenen Extremität einhergehen, ist der klinische Bedarf an therapeutischen Optionen eminent. Eine spezielle Art der Pseudarthrose ist die avitale Pseudarthrose, welcher eine mangelhafte Versorgung mit Blutgefäßen im Frakturspalt zu Grunde liegt.

In den letzten Jahren wurden vermehrt Lösungsansätze entwickelt, um die Blutversorgung im Frakturspalt zu verbessern und die Pseudarthrose so zu behandeln. Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über den derzeitigen Stand der verschiedenen entwickelten Strategien zur Verbesserung der Blutversorgung (siehe 1.2), der untersuchten Zelltypen (siehe 1.4) und der Gefäßentstehung (siehe 1.3) gegeben werden. Darauf folgend wird das Augenmerk auf die Kombination von outgrowth endothelial cells (OEC), endothelialen Progenitorzellen (EPC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) in der Forschung (siehe 1.5) sowie auf die Rolle der myeloiden Zellen bei der Bildung vaskulärer Strukturen (siehe 1.6) gelegt.

1.2. Vaskularisierungsstrategien

Bei größeren Knochendefekten, die durch ein Trauma, abnorme Stellung der Frakturenden, Knochentumorresektion, spinale Deformitäten oder Infektionen entstanden sind, gibt es aktuell noch keine zufriedenstellenden Optionen der Heilungsverbesserung. Aus diesem Grund sind autologe Grafts noch der klinische Goldstandard. Dieser birgt allerdings Probleme durch limitierte Verfügbarkeit und anschließende Komplikationen im Bereich der Entnahmestelle (7,8), wie beispielsweise chronischer Schmerz, nervale Verletzung, Hämatombildung, Infektionen sowie kosmetische Probleme (9).

Allogene Implantate stellen eine alternative Option dar, welche dagegen vermehrt immunologische Abstoßungsreaktionen zeigen sowie Risiken der Krankheitsübertragung und eine hohe Misserfolgsrate beinhalten (10).

Als Antwort auf die drängende Nachfrage nach neueren effektiven Knochendefektheilungsoptionen gibt es mehrere weiterentwickelte Ansätze, die seit einiger Zeit verfolgt werden.

Ein möglicher Ansatz beruht auf der Verwendung von strukturgebenden Biomaterialien, sogenannten Scaffolds.

Scaffolds stellen 3D (dreidimensional) -Konstrukte dar, welche Zellen und Gewebe eine Oberfläche zum Wachsen sowie einen Ersatz der extrazellulären Matrix zur Verfügung stellen. Diese können durch mechanische Stabilisierung des Defektes sowie Unterstützung der Proliferation und Differenzierung von Zellen die

Knochenheilung beeinflussen. Es lassen sich natürliche und synthetische Biomaterialien unterscheiden.

Im Vergleich zu synthetischen Biomaterialien zeigen natürliche Biomaterialien wie Kollagen oder Hyaluronsäure sowohl eine bessere Zelladhäsion als auch bessere chemotaktische Antworten in Kombination mit Chemokinen (11).

Synthetische Polymere hingegen erlauben aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften eine bessere Anpassung ihres Designs an die gewünschte Struktur des Defektes (12).

Zusätzlich beeinflussen unterschiedliche physikalische Faktoren der Scaffold-Struktur das Einwachsen der Gefäße in das Biomaterial. So hängen die Porendichte sowie die Porengröße als auch die Interkonnektivität der Poren mit dem Erfolg der Perfusion des Scaffolds zusammen (13–15).

Zu den Biomaterial-basierten Implantaten werden auch Hydrogele gezählt. Diese sind Biomaterialien mit hohem Wassergehalt, die sich positiv auf den Transport und Austausch von löslichen Stoffen auswirken und dadurch ein Extrazellulärmatrix-ähnliches Milieu schaffen, welches die Interaktion, Differenzierung und Adhäsion von Zellen und die Entwicklung eines funktionalen vaskulären Netzwerks verbessert (16–19). Bei der Co-Applikation von Stammzellen mit Hydrogelen waren positive Effekte auf Geweberegeneration bzw. -bildung, auch unter Verbesserung der Vaskularisierung, nachweisbar (20,21).

Gegenüber festen Biomaterialien zeigt sich bei Hydrogelen eine deutlich homogenere Zellverteilung innerhalb des Gels sowie ein verbesserter Zu- und Abtransport von Abbauprodukten und Nährstoffen im Vergleich zu Festkörper-basierten Implantat-Materialien (16,22,23). Des Weiteren zeigt die minimal-invasive Injektion von Hydrogelen einen geringeren Weichteilschaden im Vergleich zur Implantation von *in vitro* generierten Konstrukten. Außerdem passen sich Hydrogele an die Struktur des Knochendefektes an und ihre Bildung kann *in situ* durch verschiedene Faktoren wie beispielweise thermische oder UV-Licht-Einflüsse induziert werden.

Matrigel®, das speziell in dieser Versuchsreihe zur subkutanen Injektion verschiedener Zellpopulationen verwendet wurde, besteht zum Großteil aus der gelösten Basalmembran des murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkoms, welches besonders viel extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin, Kollagen IV, Proteoglykane

sowie Entactin/Nidogen enthält (24,25). Während Matrigel® bei 4 °C einen flüssigen Aggregatzustand aufweist, bildet es bei 37 °C ein strukturgebendes Hydrogel aus. In Ergänzung muss konstatiert werden, dass die Nutzung dieser aus tierischem Material gewonnenen Hydrogele im humanmedizinischen Bereich meist wegen der Sorge vor potentiellen immunogenen Reaktionen verboten ist (26).

Es zeigt sich außerdem, dass bioartifizell hergestelltes, nicht vaskularisiertes Knochenersatzgewebe bei einer Implantation von innen heraus absterben würde, da eine ausreichende Versorgung von metabolisch aktivem Gewebe nur bis zu einer Diffusionsstrecke von circa 200 µm von der nächstgelegenen Kapillare gewährleistet werden kann (27).

Ein Absterben bei einer größeren Distanz zum versorgenden Gefäßstumpf kann verhindert werden, indem man das Einsprossen von kapillären Strukturen nach der Implantation des Scaffolds durch gezielte Applikation von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und PDGF (vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor und platelet derived growth factor) induziert. Mit dieser Methode zeigten sich gute Ergebnisse (28). Allerdings ist durch die einmalige Applikation keine dauerhaft physiologische Konzentration der Wachstumsfaktoren zu erreichen. Daher zeigt sich ein besseres Vaskularisierungsverhalten, wenn die Scaffolds mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren im Sinne eines Deliverysystems kombiniert werden, welches eine kontrollierte Abgabe von angiogenen Faktoren ermöglicht (29,30).

Eine weitere Strategie die Vaskularisierung auf Biomaterial-basierten Knochenkonstrukten zu verbessern, besteht aus der präimplantativen Kombination von Biomaterialien mit autologen Zellen, die aus Spendermaterial isoliert werden und am Prozess der Blutgefäßbildung entscheidend beteiligt sind. Diese Prävaskularisierung induziert vor der Implantation die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen, die dann zeitnah einen Anschluss an das mikrovaskuläre Netzwerk des Empfängers finden sollen (31–33).

Zunächst konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass OEC, eine Zellpopulation, die aus den EPC hervorgeht (34,35), ein hohes proliferatives und angiogenes Potential besitzt und somit im Prozess der Vaskularisierung ebenso einen positiven Effekt ausüben kann (36,37).

Des Weiteren wurden Monokulturen aus OEC oder endothelialen Vorläuferzellen, EPC, genutzt, um eine verbesserte Vaskularisierung zu schaffen. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass diese Zellen direkt vaskuläre Netzwerke generieren oder durch parakrine Mechanismen die Gefäßbildung unterstützen können (38,39).

Unterschiedliche Stimuli führen zur Ausbildung von mikrovaskulären Strukturen mit einem tubulärem Lumen durch OEC (40,41). Die Ausbildung dieser Strukturen und das damit verbundene therapeutische Potential konnten bei einer Besiedlung von Seidenfibroin mit OEC im Sinne einer präimplantativen *in vitro* Vaskularisierung gezeigt werden (42).

In einer weiteren Studie konnte durch Triple-Kulturen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), outgrowth endothelial cells (OEC) und endothelialen Progenitorzellen (EPC) mit myeloiden Eigenschaften die Bildung, die Stabilität und die Länge der sich bildenden vaskulären Strukturen positiv beeinflusst werden (43).

1.3. Steuerung der Angiogenese

Grundsätzlich lassen sich zwei Formen der Blutgefäßbildung unterscheiden: Vaskulogenese und Angiogenese. Vaskulogenese beschreibt die Formierung eines Blutgefäßes durch eine Progenitorzelle, einen Angioblasten oder einen Hämangioblasten, während Angiogenese eine Entwicklung von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen durch Proliferation und Aussprossung neuer Gefäße beschreibt (44). Beide Prozesse sind allerdings nicht strikt trennbar und laufen vermutlich parallel zueinander ab.

Vaskulogenese kennzeichnet die Entwicklung von Blutgefäßen vor allem während der Embryonalphase und bedingt daher auch die Entstehung der Blutversorgung von embryonalem Knochen. Hierbei entstehen Gefäße *de novo* aus mesodermen Vorläuferzellen, die zunächst zu Hämangioblasten differenzieren. Diese stellen den gemeinsamen Ursprung von hämatopoetischen Stammzellen und Angioblasten dar. Unter Einfluss von VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) sowie Flk-1 (Fetal Liver Kinase-1) findet eine weitere Differenzierung zu endothelialen Vorläuferzellen statt (45).

Durch Migration, Aggregation und Differenzierung bildet sich letztlich ein aus Endothelzellen bestehender primärer Kapillarplexus. Dieser wird durch den Prozess der non-sprouting Angiogenese zu einem größeren Netzwerk erweitert. Die non-

sprouting Angiogenese (Intussuszeption) beschreibt das Einwachsen von interstitiellen Gewebesäulen in bereits existierende Gefäße entweder durch seitliches Einfalten der Gefäßwand oder durch Verbindung sich gegenüberliegender Wandanteile bei kollabierenden Gefäßen (46,47). Ähnlich der Reifephase bei der Angiogenese stabilisieren auch hier Perizyten sowie glatte Muskelzellen das Gefäß.

Angiogenese dagegen beschreibt den Vorgang der Gefäßneubildung im adulten Organismus, so auch bei der Regeneration von Knochen.

Der Prozess der Angiogenese kann in zwei wesentliche Phasen unterschieden werden: Zum einen die Aktivierungs- und zum anderen die Reifephase (siehe Abb. 1). Ausgangspunkt der Angiogenese und damit Beginn der Aktivierungsphase ist zunächst die Vasodilatation durch die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO). Hierbei kommt es zu einer Unterversorgung des betroffenen Gebietes mit Blut und Nährstoffen, die vermehrt zur Freisetzung von HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor) führt (48). Der erhöhte Spiegel von HIF-1 induziert die Sekretion von VEGF, von dem in mehreren *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte, dass die MSC VEGF in entscheidenden Mengen produzieren (49,50).

Durch die vermehrte Expression von VEGF kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der bereits vorhandenen Blutgefäße (51).

Die Basalmembran sowie die extrazelluläre Matrix nahe dem angiogenen Stimulus werden durch sezernierte Matrixmetalloproteasen (MMP), Protease-Inhibitoren oder Plasminogen-Aktivatoren degradiert (52,53). Es bildet sich durch extrazelluläre Proteine ein grundlegendes Gerüst für die Endothelzellen. Angiopoetin-2 destabilisiert hierauf die umliegenden Gefäße, so dass sich Endothelzellen aus dem Zellverbund lösen und durch die Interaktion mit VEGF zur Stelle der Gefäßaussprossung migrieren können (54). Darauf folgend formiert sich durch die immigrierten Endothelzellen ein Lumen und letztlich kann durch Mitose das Längenwachstum des Gefäßes erfolgen.

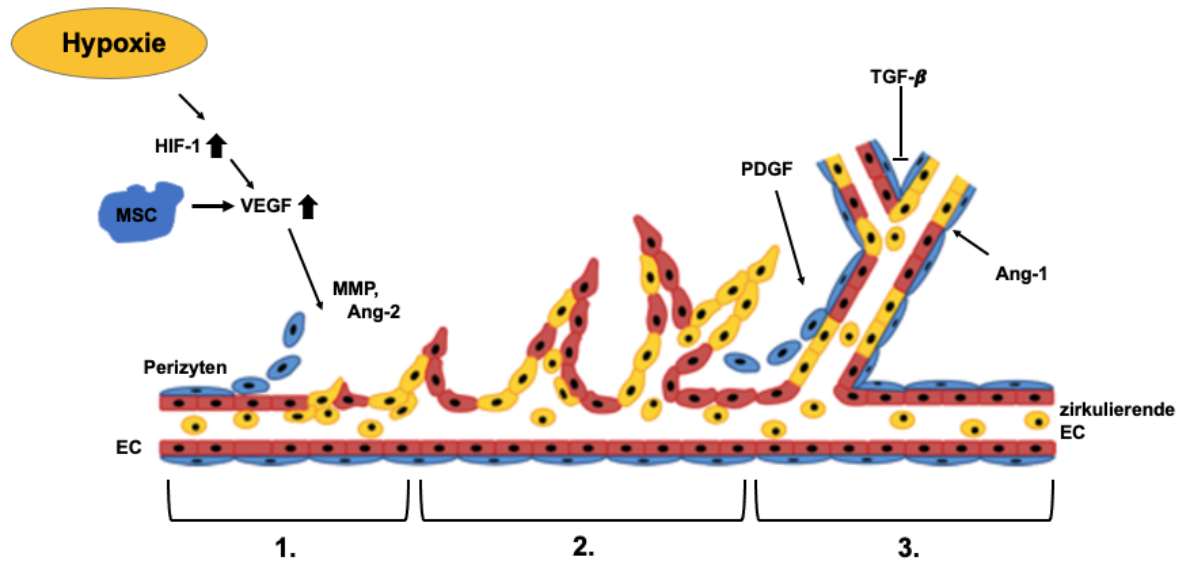


Abb. 1 - Die schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der Angiogenese und der wichtigsten molekularen Faktoren. 1. Die Initiierung der Angiogenese mit Degradierung der Basalmembran, 2. Die Formierung neuer vaskulärer Strukturen durch Migration, Aggregation und Differenzierung, 3. Stabilisierung und Reifung der neuformierten Gefäße; HIF-1: Hypoxie-induzierter Faktor 1, VEGF: vascular endothelial growth factor, MSC: mesenchymale Stammzellen, MMP: Matrixmetalloprotease, Ang-2: Angiopoetin-2, PDGF: platelet derived growth factor, Ang-1: Angiopoetin-1, TGF- β : transforming growth factor beta; EC: endotheliale Zellen; adaptiert und modifiziert nach Laschke et al. 2011 (55) und Lauttia 2014 (56)

Mit dem Beginn der Reifephase werden durch die Sekretion von PDGF Perizyten sowie glatte Muskelzellen rekrutiert, die das Gefäßgerüst ummanteln und sich positiv auf die Stabilisierung und die Ausdifferenzierung auswirken (57).

Abschließend inhibiert transforming growth factor (TGF- β /ALK-5) die Proliferation von Perizyten sowie glatten Muskelzellen und sezerniertes Angiopoetin-1 moderiert eine verbesserte Zelladhäsion zwischen den Perizyten und den Endothelzellen sowie den Endothelzellen untereinander, um eine Stabilisierung der Gefäße sowie deren mechanischen Eigenschaften zu gewährleisten (58).

1.4. Eigenschaften der endothelialen Progenitorzellen

Die Annahme, dass die Blutgefäßbildung mit Beteiligung der endothelialen Vorläuferzellen nur in der Embryonalphase und nicht im adulten Organismus stattfindet, hatte lange Bestand. 1997 wurden die EPC von Asahara und Isner beschrieben und ihre Beteiligung an Neovaskularisierungsprozessen *in vivo* und *in vitro* aufgedeckt (59). Seitdem wird von einem signifikanten Beitrag der EPC zur

Blutgefäßentwicklung nicht nur in embryonalem, sondern auch in ischämischem, malignem und entzündetem adultem Gewebe ausgegangen (60,61).

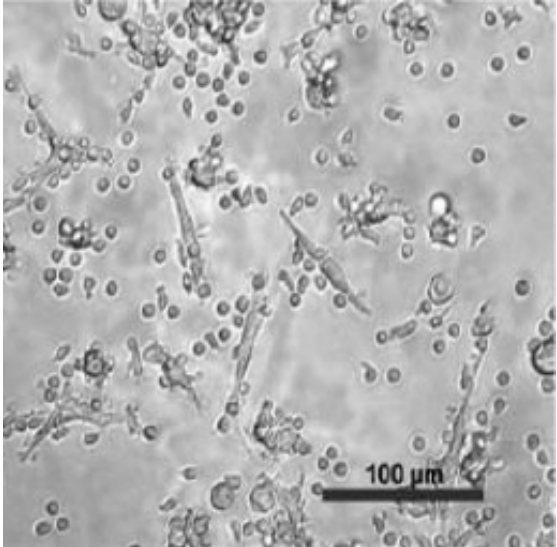
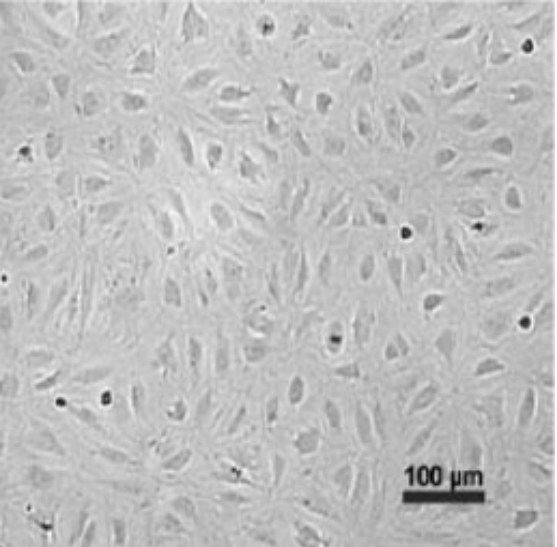
Endotheliale Progenitorzellen aus peripherem Blut stellen damit eine Quelle autologer Zellen mit hohem angiogenem Potential dar, welche minimalinvasiv gewonnen werden können und dadurch eine große Bedeutung im Bereich der regenerativen Medizin besitzen.

Eine Vielzahl an Studien und Veröffentlichungen hat sich über die letzten Jahre mit den EPC beschäftigt. Die Charakterisierung, Identifikation und Definition variierten allerdings deutlich in diesen Studien. Endotheliale Progenitorzellen können deshalb nicht als homogene Zellfraktion bezeichnet werden.

Anhand von unterschiedlichen Isolationstechniken konnten aus der mononukleären Zellschicht bereits mehrere Zelltypen beschrieben werden. Zwei dieser Zelltypen wurden bereits aufgrund ihres zeitlichen Auftretens und ihrer funktionellen Eigenschaften klassifiziert: frühe EPC und die OEC (34).

Nach sieben Tagen Kultivierung stellen sich die EPC dar und zeigen mikroskopisch eine Spindelzell-Morphologie (62). Obwohl sie einige endotheliale Marker wie CD31 (cluster of differentiation), vWF (von-Willebrand-Faktor) und VE-Cadherin exprimieren, zeigen diese Zellen keine typische endotheliale Morphologie und auch nur ein geringes proliferatives Potential (42). Zusätzlich weisen EPC auch hämatopoetische Marker wie CD45 und CD14 auf (63).

OEC hingegen treten in kleineren Kolonien erst nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen auf und zeigen mikroskopisch eine kopfsteinpflasterartige Morphologie (38) (siehe Tab. 1). Außerdem besitzen diese Zellen ein hohes proliferatives Potential und die Fähigkeit zur Bildung von angiogenen Strukturen. OEC exprimieren vermehrt CD34 und CD146 und zeigen ein stabiles endotheliales Erscheinungsbild (64). Im Gegensatz zu EPC bilden OEC in vitro in der Kombination mit Matrigel® angiogene Strukturen und unterstützen in vivo den Aufbau vaskularisierter Strukturen (50,65,66).

Endothelial progenitor cells (EPC)	Outgrowth endothelial cells (OEC)
	
Spindelförmige Morphologie	Kopfsteinpflasterartige Morphologie
nach 7 Tagen in Kultur, Mehrheit bei Isolation	nach 3 Wochen Kultivierung
CD45, CD31, CD14	CD31, CD34, CD146
Niedrige Proliferationsrate	Hohe Proliferationsrate
Keine Bildung vaskulärer Strukturen	Bildung tubulär vaskulärer Strukturen
Sekretion von angiogenen Faktoren	Hohes vaskulogenes Potential

Tab. 1 - Überblick über die Morphologie sowie weiterer Eigenschaften der EPC und OEC; Bilder im Rahmen der Arbeitsgruppe lichtmikroskopisch erhoben

1.5. Co-Kulturen – therapeutische Optionen mit OEC, EPC und MSC

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, die in verschiedene Gewebetypen wie Knorpel, Knochen und Fettgewebe differenzieren können. Die Zellen können aus unterschiedlichen Quellen gewonnen werden. Die Wichtigsten stellen Fettgewebe, Nabelschnurmatrix und Fruchtwasser, vor allem aber Knochenmark dar. Aufgrund der Einfachheit der Isolation und der hohen Expansionsrate in der Zellkultur finden die MSC Anwendung im Knochen Tissue Engineering. Die Verwendung der Zellen in der Monokultur zeigte schon früh vielversprechende Ergebnisse bei der Knochenheilung (67–69).

Ein Grund hierfür ist unter anderem die bei der Frakturheilung erfolgende Rekrutierung von MSC. Die Rekrutierung der MSC erfolgt durch Sekretion von Faktoren wie IGF-1

(Insulin-like growth factor 1), IL-10 (Interleukin-10) und BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) (siehe Abb. 2) von myeloiden Zellen, wie z.B. Makrophagen oder auch den EPC. Zusätzlich sind die MSC vermutlich ein Faktor einerseits bei der Transdifferenzierung von M1- zu M2-Makrophagen sowie andererseits bei der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Osteoklasten und damit der Regulation des Mikromilieus am Ort der Fraktur (70). Darüber hinaus verstärken die MSC neben lokalen Heilungsprozessen durch Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen auch die Differenzierung sowie die Proliferation weiterer Stammzellen (71). Ebenso wird durch die Sekretion von pro-angiogenen Faktoren wie FGF-2 (fibroblast growth factor-2), VEGF und auch Angiopoetin-1 die Proliferation und Differenzierung von endothelialen Zellen stimuliert, welche wiederum osteogene Faktoren sezernieren, welche die Differenzierung von den MSC begünstigen (72,73). So konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass eine Co-Kultur der beiden Zelltypen eine effektivere Gefäßbildung im Vergleich zu der Monokultur bewirkt (43,74,75).

Loibl et al. (76) zeigten außerdem, dass die MSC als die größte Quelle der Perizyten gelten. Sie besitzen durch die Sekretion von Angiopoetin-1 und dessen Bindung an den Tie-2-Rezeptor der Endothelzellen des Gefäßes einen ebenso stabilisierenden Einfluss auf das Gefäßnetzwerk bei dessen Bildung.

Auch die OEC zeigten durch die Expression von MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1) und der damit verbundenen Proliferation von EPC sowie MSC und der Induktion der Produktion von VEGF einen zusätzlichen Einfluss auf die Angiogenese (77).

Nebst der Nutzung von Co-Kulturen als therapeutische Optionen zur gezielten Verbesserung von Vaskularisierungsprozessen ist die Nutzung von Co-Kultur-Modellen auch geeignet, um die Auswirkungen von biologischen Faktoren auf die Vaskularisierung darzustellen.

Ein Beispiel hierfür ist der in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesene anti-angiogene Effekt der aus *Fucus vesiculosus* extrahierten bioaktiven Substanz Fucoidan, welches ein hohes Molekulargewicht aufweist, auf die Co-Kultur-Modelle von OEC und MSC respektive OEC und MG63 (eine Osteosarkom-Zelllinie) (78). Je nach Spezies, Zeitpunkt der Ernte, Gewinnungsmethode oder Molekularstruktur zeigt Fucoidan unterschiedliche pro- bzw. anti-angiogene Effekte in Co-Kultur-Modellen (79). Darüber

hinaus weist Fucoidan eine anti-virale, anti-inflammatorische und auch anti-thrombogene Wirkung auf.

Durch den Einfluss des von uns verwendeten Fucoidans mit hohem Molekulargewicht konnten wir in unserem Versuchsaufbau die Angiogenese sowie die Knochenregeneration negativ beeinflussen. Im Gegensatz hierzu konnte Fucoidan mit niedrigem Molekulargewicht in Versuchsreihen durch Erhöhung des SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) die Rekrutierung von EPC und dadurch eine verbesserte therapeutische Revaskularisierung zeigen (80).

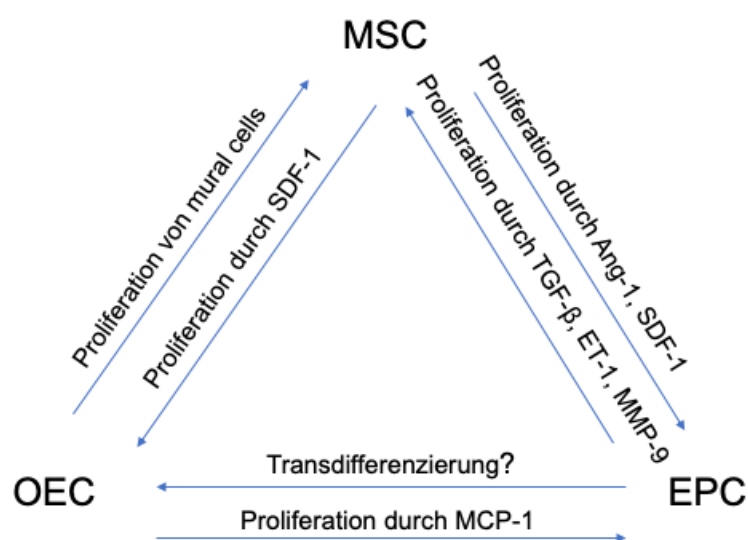


Abb. 2 - Darstellung des Einflusses der verschiedenen Faktoren und parakrinen Mechanismen auf die Proliferation und Differenzierung von MSC, OEC und EPC. Abkürzungen: MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1, Ang-1: Angiopoetin - 1, SDF-1: stromal cell-derived factor 1, TGF-β: Transforming growth factor beta, ET-1: Endothelin-1, MMP-9: Matrixmetalloprotease 9 (77,81–85)

Die Bildung angiogener Strukturen beruht auf der Interaktion und Kommunikation der verschiedenen involvierten Zelltypen. Dabei spielen sowohl parakrine Mechanismen als auch die direkte Zellkommunikation eine wesentliche Rolle (50,86).

Diese Kommunikation der Zelltypen bei der Neovaskularisierung *in vitro* zeigt einen hohen Grad an Komplexität, spiegelt aber dennoch nicht die Bedingungen im Organismus wider (87). Daher sind Co-Kulturen eine gute Option, um sich dem Verständnis des Regenerationsprozesses *in vivo* zu nähern.

1.6. Rolle der myeloiden Zellen

Myeloide und lymphoide Zellen differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen, die vorrangig im Knochenmark zu finden sind. Zu den myeloiden Zellen gehören zum Beispiel die Granulozyten, Monozyten sowie die dendritischen Zellen. Die myeloiden Zellen weisen verschiedene Verhaltensweisen auf. So können sie im Blut zirkulieren, von dort in das Gewebe migrieren und hier verschiedene Wachstumsfaktoren und Enzyme sezernieren (88).

Ein Teil der myeloiden Zelllinie sind Makrophagen, die sich aus monozytären Progenitorzellen differenzieren. Je nach Mikromilieu können sich Makrophagen in verschiedene Phänotypen differenzieren und sind daher ebenso eine Quelle für Osteoklasten (89).

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen den M1- und M2- Makrophagen. Die M1-Makrophagen werden hauptsächlich zu Beginn einer Entzündungsreaktion durch Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferon- γ als auch mikrobielle Substanzen wie Lipopolysaccharid klassisch aktiviert und sind mit der aktiven mikrobiellen Abwehr und pro-inflammatorischen Eigenschaften assoziiert (90). M1-Makrophagen sind charakterisiert durch die Sekretion von IL-6, IL-1 β sowie iNOS (inducible NO-Synthase) (91).

Die M2-Makrophagen hingegen sind eher als anti-inflammatorische und pro-angiogene Zelltypen beschrieben, die in der Geweberegeneration und im vaskulären Umbau mitwirken (92). Sie exprimieren hauptsächlich Marker wie CD163, CD206 und IL-10, aber auch CD11b sowie CD68. Ihre pro-angiogenen Eigenschaften erhalten sie durch die Sekretion von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF, Arginase-1, PlGF (placental growth factor) und FGF2 sowie der Sekretion von Faktoren, die den Umbau von Extrazellulärmatrix bedingen (MMP, Kathepsine) (93,94).

In neueren Studien konnte der Einfluss von myeloiden Zellen auf die Angiogenese nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in der Regeneration von Gewebe im adulten Organismus gezeigt werden (95–97).

Zusätzlich wurde in Studien eine mögliche Quelle der myeloiden Zellen aus den mononukleären Zellen diskutiert (43). Hiernach teilen myeloide angiogene Zellen und EPC viele ähnliche Charakteristika bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern wie CD11b, CD68 und CD206 sowie der Sekretion von pro-angiogenen Faktoren als

auch bezüglich der mit diesen Eigenschaften im Zusammenhang stehenden Relevanz bei der Blutgefäßbildung (98–100).

In Bezug hierzu zeigten Medina et al. (101), dass das von myeloiden Zellen sezernierte IL-8 in der Lage ist, den VEGF-R2 an der Zelloberfläche reifer Endothelzellen unabhängig von dem Liganden VEGF zu aktivieren. Dieser Signalweg führt einerseits über die Aktivierung der Ras-Kaskade und letztlich der vermehrten Genexpression zur Proliferation der Endothelzelle. Andererseits führen beispielsweise Signalpfade der MAP-Kinase (mitogen-activated protein) und die Inhibition der Caspase zu Migration und Differenzierung der Zellen sowie der Formation von angiogenen Strukturen (102). Die bereits oben angesprochene Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP) zu Beginn der Blutgefäßbildung ist ebenfalls auf myeloide Zellen zurückzuführen (103,104).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann den myeloiden Zellen die Fähigkeit zugesprochen werden, die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu stimulieren. Eine Eingliederung der EPC in die vaskulären Strukturen im Sinne einer Transdifferenzierung ist zum momentanen Zeitpunkt noch fraglich.

Auf der Basis dieser wissenschaftlichen Daten besteht Grund zur Annahme, dass EPC, wenn sie sich in Teilen wie alternative M2-Makrophagen verhalten, und somit durch die Sekretion von IL-8 und anderen pro-angiogenen Faktoren die Angiogenese mitbeeinflussen, einen großen klinischen Nutzen besitzen.

1.7. Fragestellung der Studie

Ziel der Arbeit ist es, einen Beitrag zur weiteren Optimierung von Strategien zur Vaskularisierung bei Knochendefekten und den damit verbundenen verbesserten therapeutischen Optionen zu leisten. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Verwendung von EPC sowie OEC, isoliert aus peripherem Blut, und deren *in vivo* Co-Applikation mit MSC aus dem Knochenmark.

Die Arbeitsgruppe hat sich in den letzten Jahren eingehend mit Vaskularisierungsstrategien für die Knochenregeneration, basierend auf Zellen des peripheren Blutes, beschäftigt. In den Vorarbeiten konnte zunächst gezeigt werden, dass OEC aus peripherem Blut in Co-Applikation mit primären osteoblastischen Zellen eine funktionale Vaskularisierung im Tiermodell ermöglichen können (32). Eine

mögliche Erklärung der verbesserten Durchblutung in der Co-Applikation *in vivo* konnten Kolbe et al. (50) bei *in vitro* Co-Kulturen von OEC mit MSC als parakrine Mechanismen aufzeigen. Dabei stellte sich in der Co-Kultur im Vergleich zur MSC-Monokultur eine Induktion vaskulärer Strukturen dar. Dies lässt sich auf die vermehrte Sekretion von angiogenen Faktoren wie VEGF, bFGF und Ang-1 durch die MSC sowie die proliferativen Einflüsse der OEC auf die MSC zurückführen.

Eine Zugabe von EPC zu der Co-Kultur aus OEC und MSC, welche in mehreren Versuchen den Vaskularisierungsprozess zusätzlich positiv beeinflusst hatten (38,39,105), zeigte eine signifikante Verbesserung der Bildung prävasculärer Strukturen *in vitro* (43). In dieser vorangegangenen Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe führte eine Zugabe von 10% EPC zur Co-Kultur aus MSC und OEC zu einer signifikant größeren Fläche vaskulärer Strukturen gegenüber der Kontrollgruppe ohne EPC sowohl nach 4 als auch nach 14 Tagen (siehe Abb. 3). Die Strukturlänge der vaskulären Strukturen war nach 14 Tagen in der Triple Kultur mit 10% EPC signifikant größer als in der Co-Kultur.

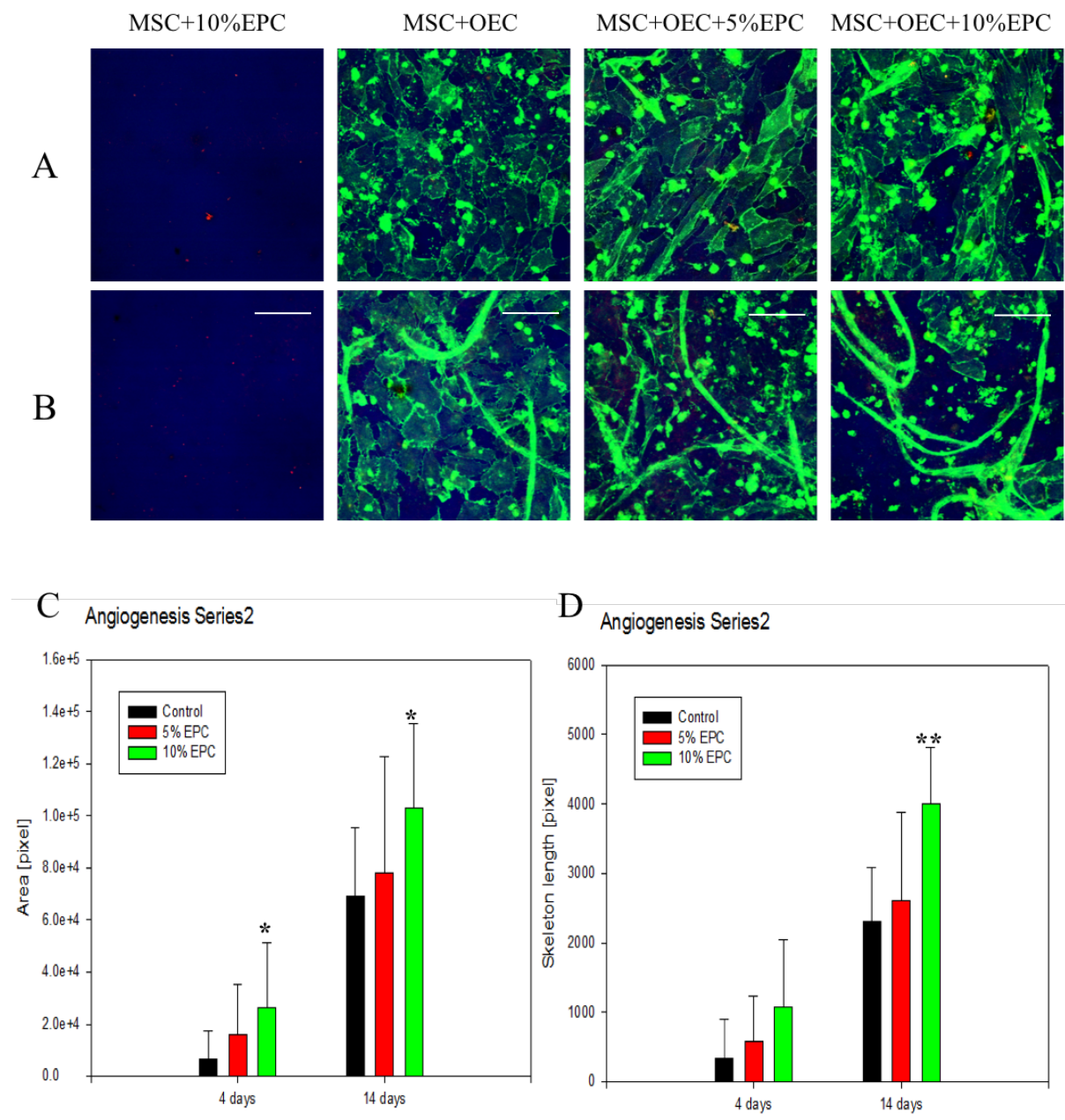


Abb. 3 - Quantifizierung von vaskulären Strukturen der Co-Kulturen mit EPC. Co-Kulturen mit MSC, OEC und EPC wurden, mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt, nach 4 Tagen (A) und 14 Tagen (B) dargestellt. Die Fläche (C) sowie die Länge der durch Co- und Triple-Kultur entstandenen vaskulären Strukturen (D) wurden nach 4 und 14 Tagen quantifiziert. Die statistische Signifikanz war definiert für einen p-Wert < 0,05. n=9 Proben, Skala: 100µm; entliehen von Shi et al. 2014 (43)

Ein weiterführender Ansatz beinhaltete die Kombination der Triple-Kultur mit einem Hydroxyapatit Polyester-Urethan Scaffold *in vitro* (81). Hier bestätigten sich die zuvor beschriebenen Effekte der EPC in der Triple-Kultur mit OEC und MSC.

In der vorliegenden Arbeit soll nun der positive Einfluss von frühen endothelialen Progenitorzellen mit myeloiden Eigenschaften auf die Neovaskularisierung mit Hilfe des Triple-Applikations-Modells aus OEC, MSC und EPC von *in vitro* nach *in vivo*

übertragen werden. Mittels histologischer Schnitte sowie immunhistochemischer Färbung sollen die vaskulären Strukturen quantifiziert werden. Dies soll Rückschlüsse zu der Interaktion innerhalb der Experimentalgruppen sowie deren Einfluss auf die Bildung angiogener Strukturen, nach Implantation der Co- und Triple-Injektionen in Kombination mit einem Hydrogel (Matrigel®) in einem NOD/SCID-Maus-Modell, erlauben (siehe Abb. 4).

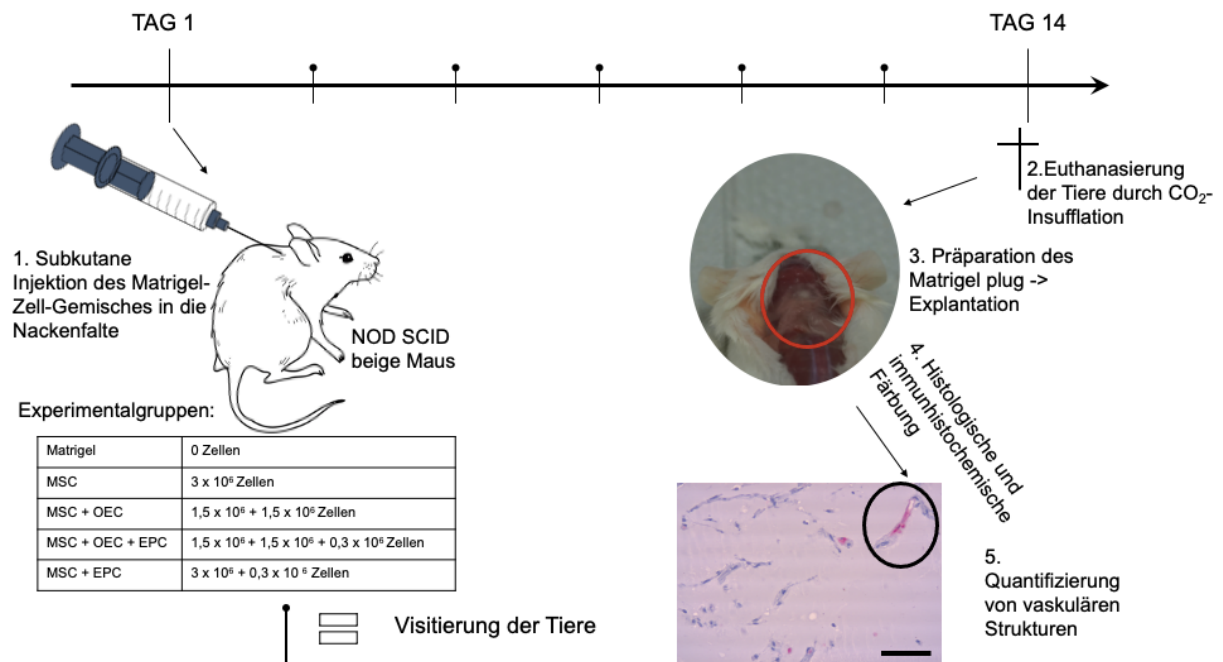


Abb. 4 – Übersicht über den Versuchsaufbau, Skala: 100µm

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Österreich
Gefrierschrank (-30 °C)	Liebherr, Österreich
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus, Kendro Laboratory Products
Eclipse 80i	Nikon, Japan
Inkubator 1 Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, USA
Inkubator 2 HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Österreich
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, D
Luer-Knochenzange	Aesculap, Tuttlingen, D
Minizentrifuge	Carl Roth, Österreich
Neubauer-Zählkammer Improved, 0,0025 cm ²	Labor Optik, Lancing, UK
Nikon DS-Fi1	Nikon, Japan
Pipettierhilfe Pipetus®, Akku-betrieben	Hirschmann, Eberstadt, D
ProScan III	Prior, USA
Rotor-Gene® Q-Cycler	Qiagen, Hilden, D
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Sicherheitswerkbank HERASafe	Thermo Fisher Scientific, USA
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, USA
Stickstoff-Lagertank Locator 4 Plus	Thermo Scientific, USA
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,
Vakuumpumpe	Integra Biosciences, D
Vortexer Vortex-Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad Typ 1004	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, D
Zentifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, USA

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläschen 18 x 18 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen Cryo Pure 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten (24 Well-Format)	TPP, Schweiz
Mikrotiterplatten (96 Well-Format)	Thermo Scientific Nunc, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Petrischale	Greiner, Solingen, D
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), serologische	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Biosphere
Reagenz- und Zentrifugenröhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellfilter (40 µm, 70 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen (175 cm ²) (T-175)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
Ampuwa® Plastipur Spüllösung	Fresenius, Bad Homburg, D
Aqua dest.	Braun, Melsungen, D
Biocoll Separating Solution	Biochrome, Berlin, D
Collagen Type I Rat Tail	BD Biosciences, Bedford, USA
Ciprobay (Ciprofloxacin)	Acros Organics, Belgien
DAKO wash buffer	Dako, Glostrup, Dänemark
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EnVision™ Detection Systems	Dako, Glostrup, Dänemark
Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (K4065)	

Entellan	Merck Millipore, USA
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Fibronectin	Millipore, Temecula, USA
Fungizone (Amphotericin B)	Lonza Biosciences, Basel, Schweiz
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Roth, Karlsruhe, D
Matrigel®	BD Biosciences, USA
Mayers Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nuclease-freies Wasser	Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA
Paraformaldehyd (4%)	USB, Cleveland, USA
phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, AUT
PicoGreen®-Reagens	Thermo Fisher Scientific, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe, D
Streptavidin HRP	R&D Systems, Bio-Techne, USA
Substrate Reagenz	R&D Systems, Bio-Techne, USA
SYBR Green Master Mix	Applied biosystems, USA
Trypan-Blau	Gibco, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, USA
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium	Hersteller
DMEM/ Ham's F-12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biochrom, Berlin, D
EGM-2 Bullet Kit (endothelial cell growth Medium 2)	Lonza Walkersville, USA
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, USA
Medienzusatz	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories, Österreich

Penicillin/Streptomycin

PAA Laboratories, Österreich

2.1.5. Verwendete Primär-Antikörper zur Darstellung der Angiogenese

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-CD31	Ratte	1:35	Dianova, Hamburg, D

2.1.6. Tiere

Name	Hersteller
Fox Chase SCID beige Mäuse (CB17.Cg-Prkdc ^{scid} Lyst ^{bg-J} /CrI)	Charles River Laboratories, D

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation und Expansion humaner endothelialer Progenitorzellen (EPC) und Outgrowth Endothelial Cells (OEC)

Endotheliale Progenitorzellen sowie outgrowth endothelial cells wurden wie bereits in anderen Protokollen (42,106,107) aus buffy coats isoliert und kultiviert (siehe Abb. 5). Die buffy coats wurden von dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt. Sie entstehen als Nebenprodukt bei der Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasmaprodukten und enthalten hauptsächlich Leukozyten sowie Monozyten, aber auch einen geringen Anteil an Erythrozyten. Die Isolation erfolgte in Übereinstimmung mit der lokalen Ethikkommission und einer schriftlichen Genehmigung der jeweiligen Spender, ihr Blut für wissenschaftliche Zwecke zu verwenden. Um die OEC sowie EPC aus den buffy coats zu gewinnen, wurden die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert. Zunächst wurde 50 ml Blut in einer 1:3-Verdünnung mit buffy coat buffer (0,4% EDTA und 0,5% FBS in PBS) versetzt, anschließend jeweils 35 ml abpipettiert, vorsichtig auf 15 ml Biocoll separating solution (Dichte von 1,1 g/ml) geschichtet und danach bei 400 x g

für 35 Minuten ohne Unterbrechung bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kam es zur Trennung von Erythrozyten/Granulozyten, Monozyten und Plasma/Thrombozyten. Während die Erythrozyten/Granulozyten aufgrund ihrer Dichte als Sediment zurückblieben, stellten sich die Monozyten als weiße Phase dar.

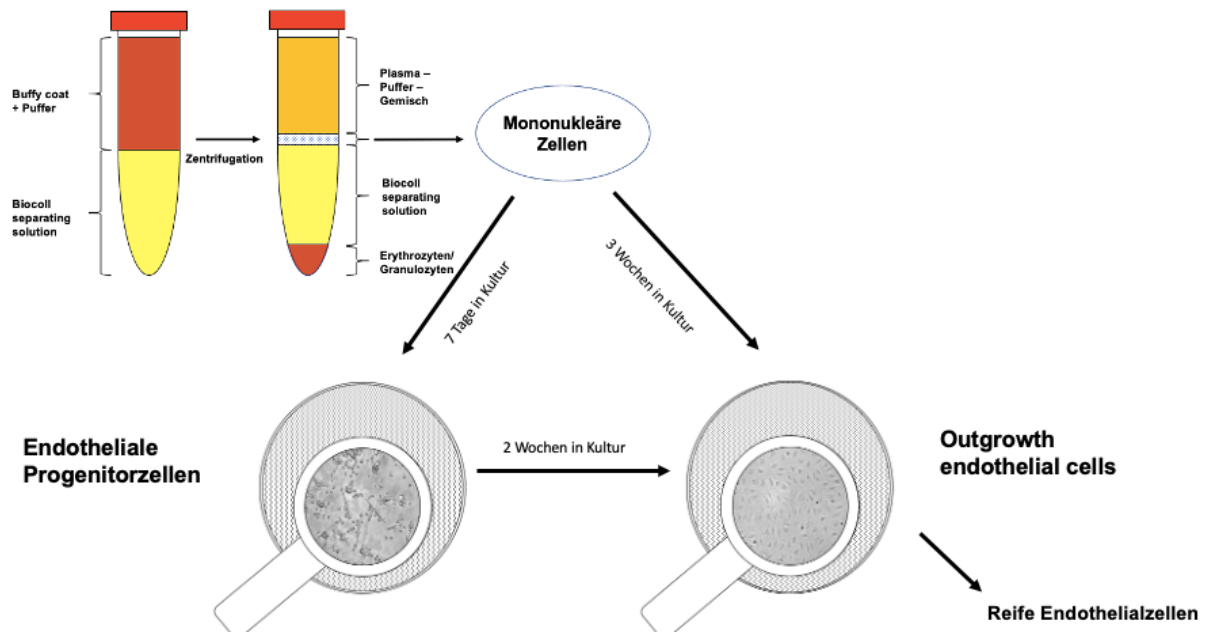


Abb. 5 - Prinzip der Isolation und Expansion von mononukleären Zellen bis zur Kultivierung von EPC und OEC

Diese mononukleäre Zellschicht wurde mit Hilfe einer 10 ml serologischen Pipette abpipettiert und erneut mit buffy coat buffer auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch bei $400 \times g$ 10 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Schritt wurde sowohl mit dem buffy coat buffer als auch erneut mit PBS wiederholt.

Die mononukleären Zellen wurden anschließend mit dem EGM-2 (EGM-2 Bullet Kit + 5% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert, die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und hiernach auf Kollagen beschichteten 24-well-plates mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/well ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden zuvor mit Kollagen ($10 \mu\text{g/ml}$) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach jeweils 48 Stunden fand ein Mediumwechsel statt.

Nach einer Woche der Kultivierung wurden adhärente Zellen durch Trypsinierung geerntet und einerseits als EPC verwendet oder andererseits erneut mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/well für die Gewinnung von OEC ausgesät.

Abschließend wurden nach 2-3 Wochen weiterer Kultivierung OEC-Kolonien mit kopfsteinpflasterartiger Morphologie ebenso trypsiniert, auf Fibronectin-beschichtete (10 µg/mL) 24-well-plates ausgesät, bei hoher Konfluenz 1:2 passagiert und weiter über mehrere Passagen expandiert.

Die OEC- bzw. EPC-Kolonien wurden freundlicherweise im Rahmen der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Isolation und Expansion mesenchymaler Stammzellen (MSC)

Humane mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von operativ entfernten Knochenteilen adulter Spender, die als Überschussmaterial u.a. bei dem Einsatz von Totalendoprothesen in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, anfielen und zur Verfügung gestellt wurden, kultiviert und expandiert, wie bereits in anderen Protokollen beschrieben (43,50). Zuvor erfolgte eine schriftliche Einwilligung der jeweiligen Spender zur wissenschaftlichen Nutzung des Materials. Die Isolation erfolgte in Übereinstimmung mit der lokalen Ethikkommission.

Mit Hilfe einer Luer-Zange wurden die Spongiosabälkchen des Knochens zunächst in eine Petrischale überführt.

Die Knochenfragmente wurden daraufhin zuerst mit tissue buffer (Medium 199 (1X) + GlutaMAX + 15% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% Fungizone + 1% Ciprofloxacin), anschließend mit PBS, gewaschen, um die enthaltenen Zellen zu lösen. Durch kräftiges Schütteln wurden die anhaftenden Zellen aus den Knochenbestandteilen gelöst. Um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erreichen, wurden zwei bis drei Waschungen mit PBS vorgenommen.

Die Waschüberstände wurden anschließend mit einem Zellsieb von 40 µm gefiltert, um die Knochenfragmente zu entfernen, und darauf bei 400 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde mit DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium, dem 20% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/cm² in eine mit Kollagen beschichtete (10 µg/ml) Kulturflasche (T-175) ausgesät. Es erfolgte nach jeweils 48 Stunden ein Mediumwechsel.

Nach 7-10 Tagen wurden die ersten konfluierend gewachsenen MSC-Kolonien in einem 1:3 Verhältnis gesplittet, expandiert und in dem osteogenic differentiation medium (ODM) für 2 Wochen kultiviert, um die Differenzierung der Zellen anzuregen. Das ODM besteht aus DMEM/Ham's F12 (1:1), dem 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.1 μM Dexamethason, 10 μM beta-Glycerophosphat sowie 50 mM Ascorbinsäure zugesetzt worden ist. Entsprechend erfolgte auch hier ein Wechsel des Mediums nach jeweils 48 Stunden.

2.2.3. Vorbereitung der Zell-Matrigel-Suspension zur Injektion

Um den Einfluss von EPC mit myeloiden Eigenschaften auf die Angiogenese darzustellen, injizierten wir Experimentalgruppen der drei bereits beschriebenen Zelltypen. Als Trägermatrix für die jeweilige Gruppe wurde Matrigel® verwendet. Die Experimentalgruppen waren wie folgend unterteilt: (1) Kontrollgruppe ohne Zellen, (2) MSC, (3) MSC + OEC, (4) MSC + OEC + 10% EPC und (5) MSC + 10% EPC (siehe Tab. 2). Je Durchlauf ergaben sich so die Vermischung von bis zu drei Zelltypen, jeweils unterschiedlicher Spender.

Experimentalgruppe	Zellzahl
Matrigel®	0 Mio.
MSC	3 Mio.
MSC + OEC	1,5 Mio. + 1,5 Mio.
MSC + OEC + 10% EPC	1,5 Mio. + 1,5 Mio. + 0,3 Mio.
MSC + 10% EPC	3 Mio. + 0,3 Mio.

Tab. 2 - Einteilung der Experimentalgruppen

Zunächst wurden für die Experimente die MSC trypsinisiert. Für die alleinige Injektion der MSC wurden 3×10^6 MSC in einem Eppendorfer Gefäß separiert und bei $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in $400 \mu\text{l}$ Matrigel® resuspendiert. Ähnlich wurde bei den Gruppen aus $1,5 \times 10^6$ MSC sowie $1,5 \times 10^6$ OEC verfahren. Bei der Co-Injektion der drei Zelltypen kamen ergänzend $0,3 \times 10^6$ EPC hinzu. Diese Zellpellets wurden ebenfalls mit Matrigel® versetzt. Um eine komplette Suspension zu gewährleisten, wurde mehrfach auf- und abpipettiert.

Die Versuche mit dem Matrigel® fanden auf Eis sowie mit zuvor bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Pipetten und Pipettenspitzen statt. Für den dritten Teilversuch des Spendersets 3

wurde ein phenol-rotes Matrigel® verwendet, welches nicht in die Auswertung eingeschlossen wurde.

2.2.4. Subkutane Injektion des Matrigel-Zell-Gemisches

Dieses Experiment wurde von der Ethikkommission des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt.

3 weibliche, 5-7 Wochen alte, Fox Chase SCID beige Mäuse (CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-⁻}/CrI; Charles River Laboratories, Deutschland) wurden pro Experimentalgruppe (siehe Tab. 2) unter keimfreien Standardbedingungen in Mikroisolationssäfen in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gehalten und mit Wasser und der üblichen standardisierten Tiernahrung ad libitum versorgt. Die Käfige waren mit Holzstreu gebettet und die Tiere wurden in einem 12-Stunden-Tag- und 12-Stunden-Nacht-Rhythmus gehalten. Nach der Anlieferung wurden die Tiere ca. eine Woche akklimatisiert, erst anschließend wurden die Versuche durchgeführt. Das Matrigel®-Zell-Gemisch wurde auf Eis gekühlt, bis es mit einer 27G Kanüle sowie einer 1 ml Tuberkulinspritze subkutan in die Nackenfalte der Mäuse injiziert wurde. Die Kanülen sowie die Spritzen wurden ebenfalls bis zu Beginn des Experiments gekühlt, um ein Erhärten der Trägermatrix zu verhindern. Im Anschluss wurden die Mäuse alle 48 Stunden visitiert, um Infektionen oder Reaktionen auf die Injektion zu beobachten. Es erfolgten insgesamt fünf Durchläufe mit unterschiedlichen Spendersets.

2.2.5. Histologie und Immunhistochemie

Nach 14 Tagen wurden die Mäuse durch die Insufflation von CO₂ (Kohlenstoffdioxid) (Flussrate 3 l/min) euthanasiert. Die Explantation der Matrigel®-Plugs erfolgte zusammen mit umliegendem Gewebe unter teilsterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pinzette sowie eines Skalpells. Das entnommene Gewebe wurde für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde zunächst eine Entwässerung des Präparats in einer aufsteigenden Ethanolreihe vorgenommen, dann wiederum mittels Xylol von Ethanol befreit und schließlich in erwärmtes, verflüssigtes Paraffin gebettet.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine immunhistochemische Färbung gegen humanes CD31 eingesetzt, um die Gefäße innerhalb der Implantationsareale identifizieren zu können. CD31 ist ein integrales Membranprotein. Es wird auf der Membranoberfläche von sich entwickelnden und adulten Endothelzellen exprimiert. Daher ist CD31 als Marker für die Angiogenese gut geeignet, da sich durch die Färbung Arteriolen, Venolen und Kapillaren nachweisen und quantifizieren lassen.

Dafür wurden jeweils zwei Schnittpräparate jedes Explantats angefertigt, wovon ein Schnittpräparat nach den im folgenden Protokoll aufgeführten Schritten immunhistochemisch angefärbt wurde.

Mithilfe einer absteigenden Ethanolreihe wurde das Explantat auf die Färbung vorbereitet. Nachdem das Präparat mehrmalig mit PBS, DAKO Waschbuffer, Aqua dest. und Proteinase K gewaschen und eine hydrophobe Barriere um das Präparat geschaffen wurde, erfolgte eine Inkubation mit 3% H₂O₂ für 30 Minuten. Hierauf wurde dann die Inkubation mit dem murinen Anti-CD31-Antikörper in einer 1:35 Verdünnung für 30 Minuten vorgenommen. Nach erneuten Waschvorgängen mit PBS und DAKO Waschpuffer wurde das Präparat zunächst mit einem DAKO-Diluent und anschließend mit einem HRP-Polymer für je 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mittels Mayer's Hämatoxylin-Lösung. Erneut wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und danach mit Entellan eingedeckt. Das zweite Schnittpräparat diente als Negativkontrolle, wobei auf den Primärantikörper zum Zwecke der Kontrolle seiner Färbespezifität verzichtet wurde. Weiterhin wurde ein Schnittpräparat einer Milz jeweils als Positivkontrolle mitgeführt. Die histologische und immunhistochemische Färbung wurden von Dr. Mike Barbeck, Sektion für Regenerative Orofaziale Medizin, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt.

2.2.6. Histomorphometrische Analyse

Als Grundlage wurde ein Computer-basiertes System zur Histomorphometrie benutzt, welches sich aus einem Mikroskop (Eclipse 80i) mit angeschlossener Digitalkamera (Nikon DS-Fi1), einem Scanning-Tisch (ProScan III) und dessen Kontrolleinheit sowie einem Controller zur manuellen Steuerung des Scanning-Tisches zusammensetzt. Zur Digitalisierung sowie zur Analyse der Schnittpräparate wurde das Software-Paket NIS

Elements Advanced Research der Firma Nikon (Version 4.10.01, Build 834, LO, Tokyo, Japan) in Kombination mit dem oben beschriebenen Computer-basierten System genutzt. Zunächst wurden die histologischen Schnittpräparate, in welchen die Gefäße basierend auf den eingebrachten humanen Zellen (CD31-Nachweis) enthalten waren, zur späteren histomorphometrischen Analyse inklusive des kompletten Implantationsbettes sowie des dazugehörigen periimplantären Gewebes digitalisiert. Die Messung der Vaskularisierung an den digitalisierten Präparaten war ebenfalls mit der Software NIS Elements der Firma Nikon möglich. Das Programm erlaubte die manuelle Messung der im Folgenden näher erläuterten Parameter der Gefäßdichte (Gefäße/Quadratmillimeter) sowie der prozentualen Vaskularisierung (Prozentualer Anteil der Gefäßfläche an der Fläche des Implantationsareals) und damit den Vergleich der Durchblutung der Implantationsareale zwischen den Studiengruppen. Die Messung dieser Parameter ermöglicht die „Anmerkungen und Messungen“-Funktion der Analysesoftware. Dabei wurde zur Bestimmung beider Parameter zunächst die Fläche des gesamten Implantationsbettes gemessen, die daraufhin in μm^2 ausgegeben wurde. Dies diente im Weiteren sowohl der Berechnung der Gefäßdichte als auch der Berechnung der prozentualen Vaskularisierung als Grundlage. Danach wurden zum Zwecke der Bestimmung der Gefäßdichte die einzelnen Gefäße des Implantationsbettes manuell umzeichnet. Die Maßangaben (Anzahl und Fläche) wurden wiederum von der Software berechnet. Das Maß der Gefäßdichte ergab sich bei der späteren Datenanalyse schließlich aus dem Quotienten aus Gefäßanzahl und der Gesamtfläche des Implantationsareals (Gefäße/ mm^2), während die prozentuale Vaskularisierung aus dem Anteil aus der Summe der Gefäßflächen an der Gesamtfläche des jeweiligen Implantationsareals berechnet wurde. Auch die histomorphometrische Analyse erfolgte dankenswerter Weise durch Dr. Mike Barbeck, Sektion für Regenerative Orofaziale Medizin, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

2.2.7. Statistische Analyse

Die Angabe der statistischen Werte erfolgte in Mittelwert \pm Standardabweichung. Die statische Auswertung der p-Werte erfolgte über das Programm R® (Version 4.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) mittels einer einfachen

Varianzanalyse (analysis of variance - ANOVA). Statistisch signifikant wurden hier Ergebnisse gewertet, deren p-Wert kleiner als 0,05 war ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung des Einflusses der myeloiden Zellen auf die Bildung angiogener Strukturen mittels quantitativer Bildanalyse

Um den Einfluss der myeloiden Zellen auf die Angiogenese *in vivo* zu untersuchen, wurden die in zurückliegenden Experimenten verwendeten Co-Kulturen aus MSC und OEC durch EPC erweitert und der Effekt der EPC als myeloide Zellen auf die Bildung angiogener Strukturen überprüft.

Nach 14 Tagen wurden die injizierten Matrigel®-Zell-Gemische als plugs entnommen und anschließend die vaskulären Strukturen mikroskopisch nach Färbung mit CD31-Antikörpern quantitativ ausgewertet. Es wurden insgesamt fünf Durchläufe mit verschiedenen Sets bei jeweils unterschiedlichen Spendern für MSC, OEC sowie EPC durchgeführt. Pro Spenderset wurden jeweils drei unterschiedliche Tiere pro Experimentalgruppe mit den Zell-Matrigel-Suspensionen behandelt. Es wurde eine Auswertung für die Gefäßanschnitte pro mm² sowie den prozentualen Anteil der Fläche der humanen Gefäße an der gesamten Implantationsfläche vorgenommen. Der Teilversuch des Spendersets 3 wurde aufgrund der Verwendung eines phenol-roten Matrigel® nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Zunächst wurde die Auswertung der Gesamtheit der Spendersets vorgenommen, anschließend eine spender-individuelle Auswertung der einzelnen Gruppen der Spendersets, um eine bessere Differenzierung und Vergleichbarkeit der Spender untereinander zu ermöglichen. Es erscheint eine spender-individuelle Darstellung insofern sinnvoll, da einerseits die genutzten Zellfraktionen der MSC sowie der EPC sehr heterogen sind und daher je Versuchsreihe einen anderen Einfluss auf die Vaskularisierung entwickeln können. Andererseits auch die Spender selbst, also die Zellen spendenden Personen, hetero- oder auch homogenere Zellfraktionen, Gesundheitszustände und hiermit einhergehend ggf. tägliche Medikamenteneinnahmen aufweisen können. Zusätzlich unterliegt auch die Angiogenese in jedem genutzten Tier einer gewissen Variabilität, so dass sich eine spender-individuelle bzw. tier-individuelle Darstellung anbietet.

3.1.1 Darstellung der Gesamtheit aller Spendersets

	Matrigel [®]	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane GefäÙe/mm²	0	0	20,97 (\pm 21,23)	17,04 (\pm 11,21)	0	0,2
Prozent Fläche humane GefäÙe (%)	0	0	1,08 (\pm 0,84)	1,11 (\pm 0,84)	0	0,9

Tab. 3 - Anzahl humaner GefäÙe pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen. Darstellung in Mittelwert \pm Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 15 pro Gruppe.

In der Auswertung aller fünf Spendersets konnten in der quantitativen Bildanalyse nur in der MSC/OEC- sowie der MSC/OEC/EPC-Gruppe humane vaskuläre Strukturen beobachtet werden. Bei Betrachtung aller Spender erhöhte die Zugabe von EPC zu der Gruppe aus MSC und OEC die Anzahl der vaskulären Strukturen gegenüber der Gruppe ohne EPC nicht (siehe Tab. 3 und Abb. 6A), hingegen blieb die Experimentalgruppe aus MSC und EPC ohne Bildung von vaskulären Strukturen. Der prozentuale Anteil der humanen GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche war in der Triple-Injektionsgruppe geringfügig erhöht gegenüber der Co-Injektion aus MSC und OEC, aber diese Differenz zeigte sich nicht statistisch signifikant (siehe Tab. 3 und Abb. 6B). Die Co-Applikation aus MSC und OEC bzw. die Triple-Applikation unter Zugabe von EPC zeigten bei jedem Spenderset histologisch den Nachweis von funktionalen, perfundierten vaskulären Strukturen. So waren teilweise in den GefäÙanschnitten Erythrozyten nachweisbar (bspw. siehe Abb. 7 MSC+OEC bzw. MSC+OEC+EPC, jeweils markiert mit dem schwarzen Pfeil).

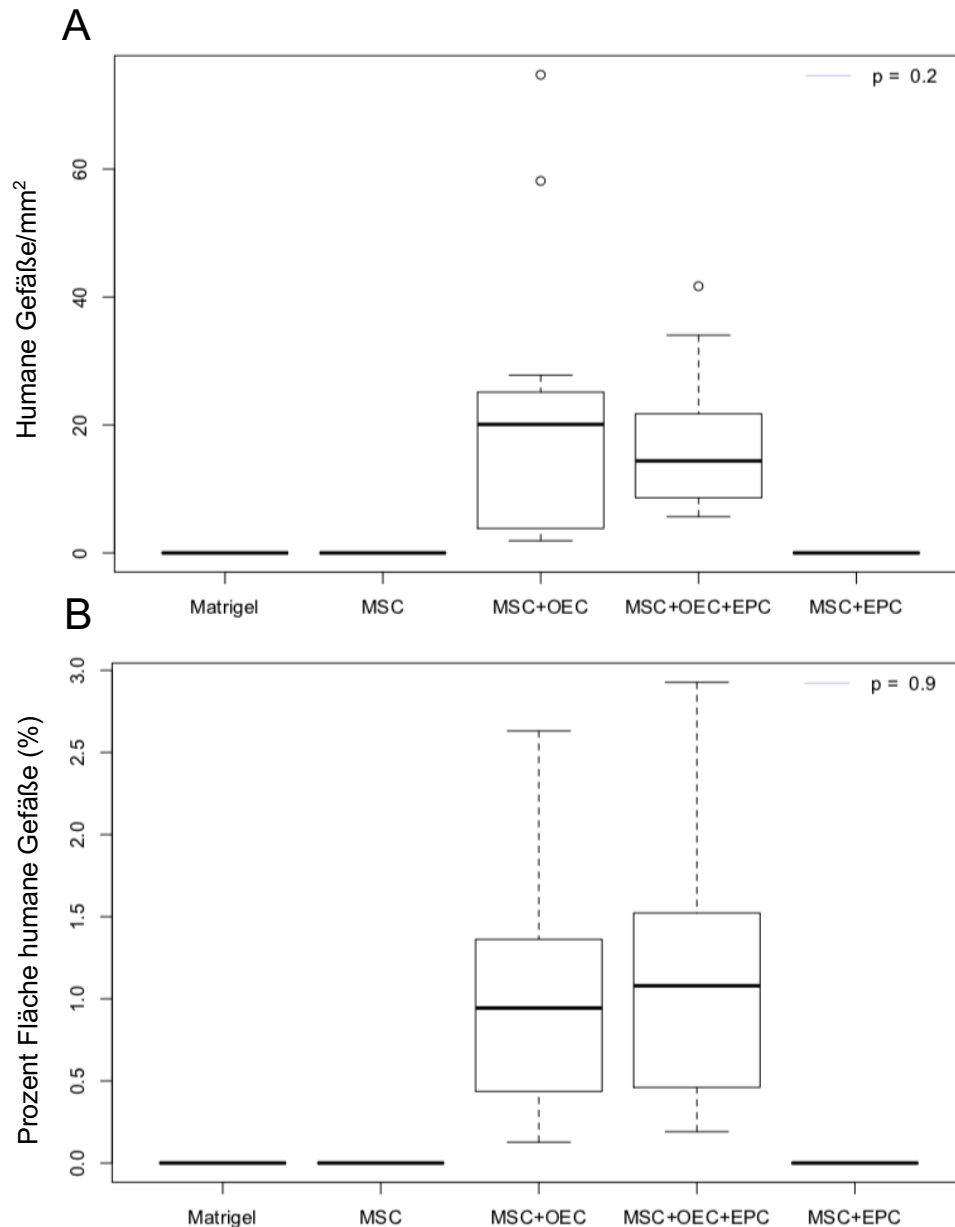


Abb. 6 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse der Gesamtheit aller Spendersets mit Anzahl der humanen GefäÙanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 15 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

3.1.2 Spenderindividuelle Darstellung

3.1.2.1 Darstellung des Spendersets 1

Die Auswertung des Spendersets 1 zeigte keine größere Anzahl von humanen GefäÙanschnitten pro mm² unter dem Zusatz der EPC zur Co-Injektion. Ebenso war der prozentuale Anteil der Fläche humaner angiogener Strukturen an der gesamten Implantationsfläche in der Co-Injektion höher als in der Triple-Injektion. Diese Differenzen waren im Rahmen der Hypothese nicht statistisch signifikant (siehe Tab.

4 und Abb. 8). In den histologischen Schnitten zeigten sich in den Gruppen Matrigel®, MSC und MSC+EPC keine Gefäßanschnitte sowie keine Färbung mit dem endothelialen Marker. Bei der Co-Injektion aus MSC+OEC hingegen war eine vermehrte Anfärbung von Zellen mit CD31-Expression zu verzeichnen. Weniger positive Strukturen waren in der Triple-Applikation zu erkennen (siehe Abb. 7).

3.1.2.2 Darstellung des Spendersets 2

Die quantitative Bildanalyse für Spenderset 2 offenbarte ebenfalls keine Steigerung der Anzahl humaner angiogener Strukturen in der Triple-Injektion, zusätzlich zeigte sich eine Differenz in dem prozentualen Anteil der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche zur Co-Injektion. Dies entsprach keiner statistischen Signifikanz (siehe Tab. 5 und Abb. 10). Auch die histologischen Schnitte zeigten eine stärkere Färbung mit dem endothelialen Marker CD31 in der Co-Applikation gegenüber der Triple-Applikation. In den übrigen Experimentalgruppen konnte keine Expression von CD31 dargestellt werden (siehe Abb. 9).

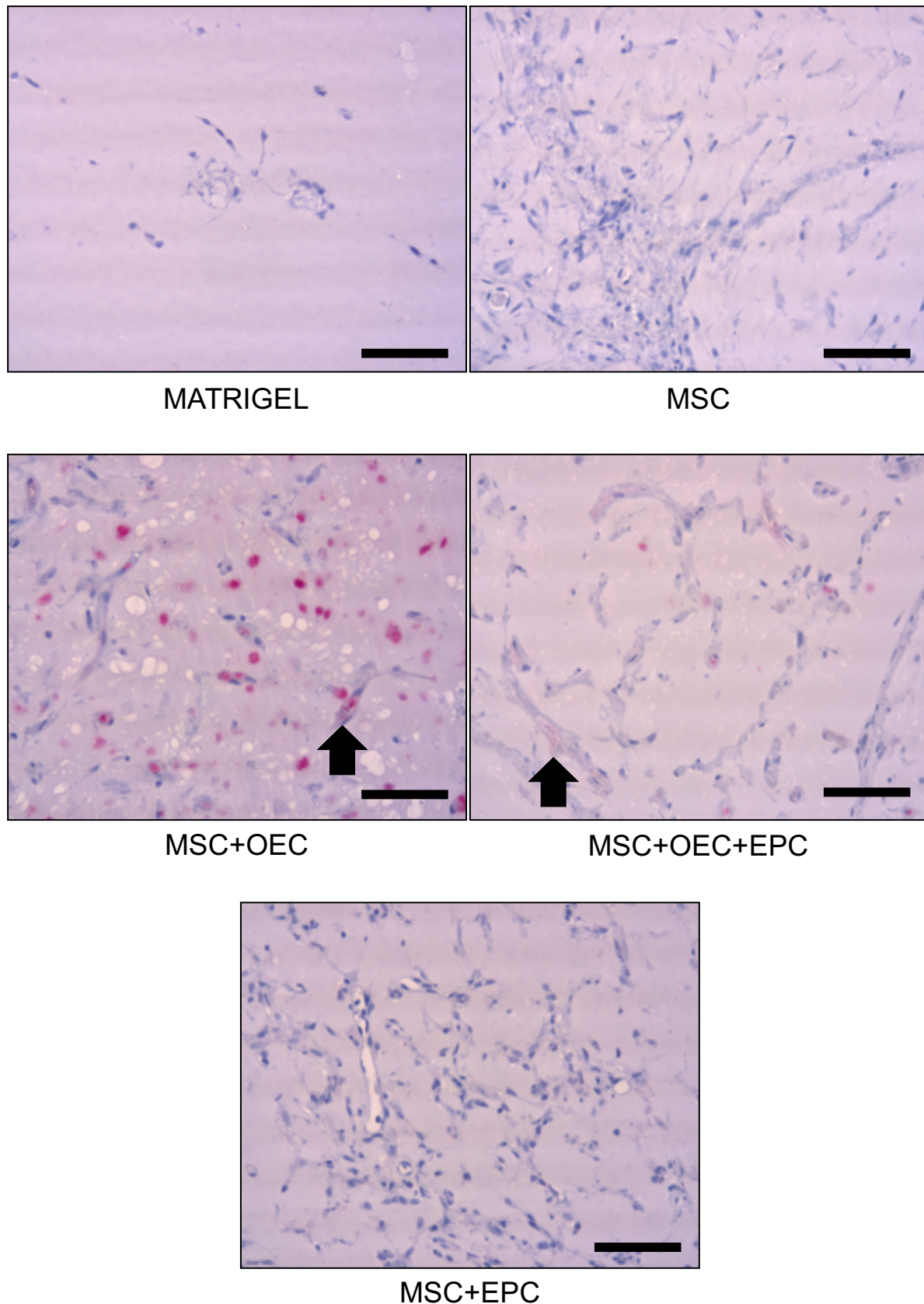


Abb. 7 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 1 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielpfeile (↑) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m

	Matrigel®	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane GefäÙe/mm²	0	0	40,93 (\pm 29,36)	25,85 (\pm 7,28)	0	0,6
Prozent Fläche humane GefäÙe (%)	0	0	1,45 (\pm 0,83)	1,12 (\pm 0,49)	0	0,9

Tab. 4 - Anzahl humaner GefäÙe pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 1. Darstellung in Mittelwert \pm Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.

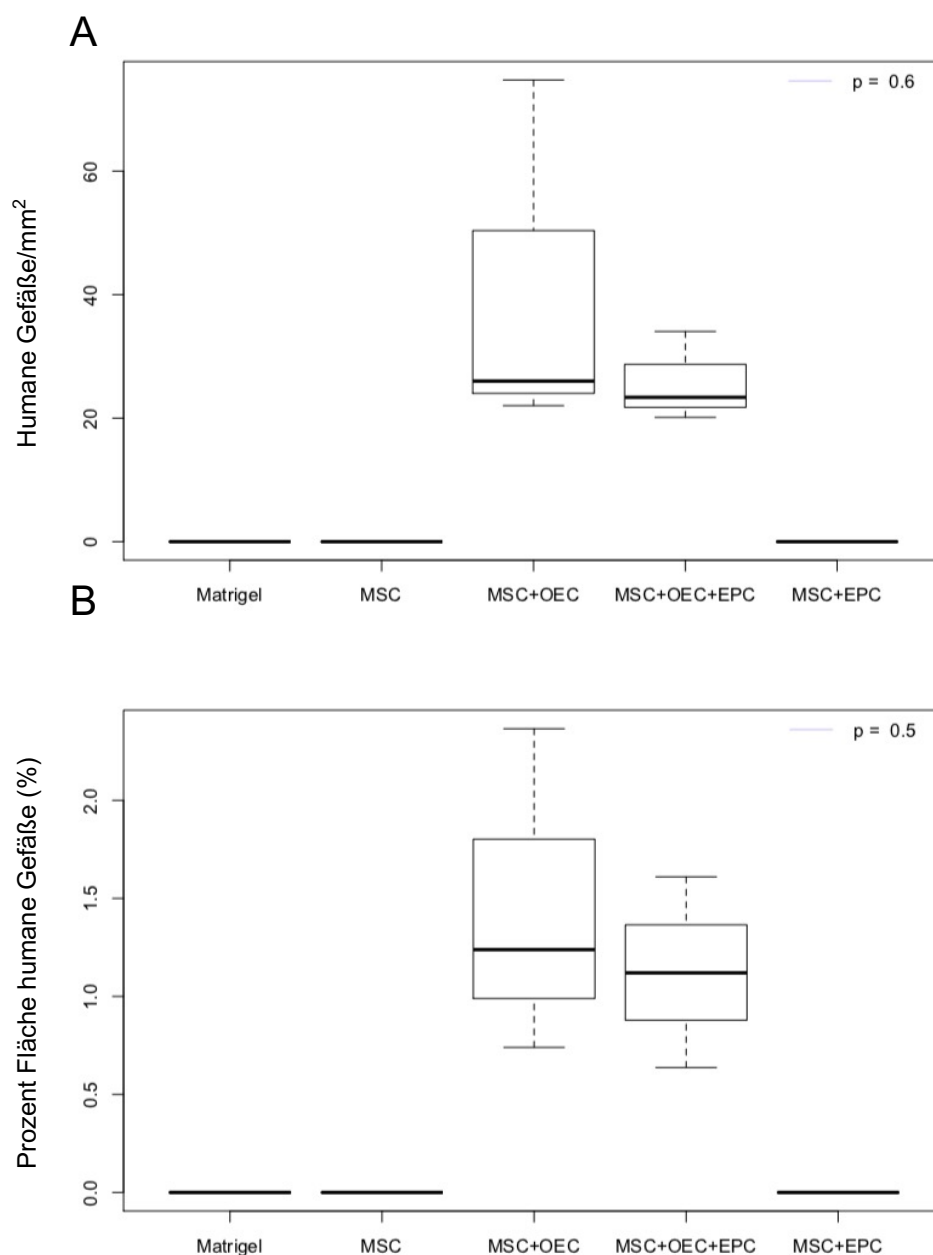


Abb. 8 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des ersten Spendersets mit Anzahl der humanen GefäÙanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

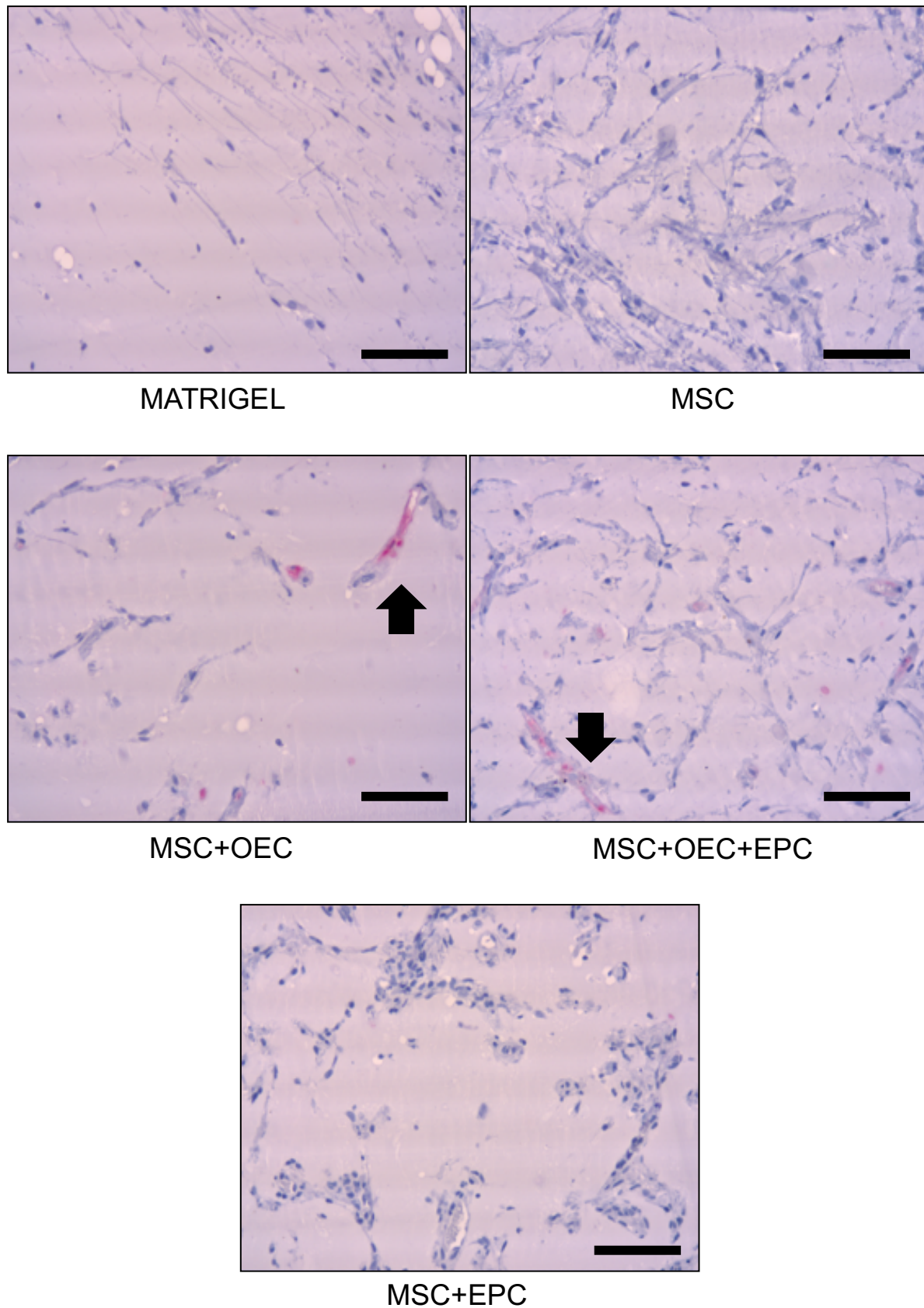


Abb. 9 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 2 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (\hat{u}) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m

	Matrigel®	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane Gefäße/mm²	0	0	30,70 (± 24,23)	9,75 (± 4,38)	0	0,1
Prozent Fläche humane Gefäße (%)	0	0	1,40 (± 0,98)	0,36 (± 0,01)	0	0,3

Tab. 5 - Anzahl humaner Gefäße pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 2. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.

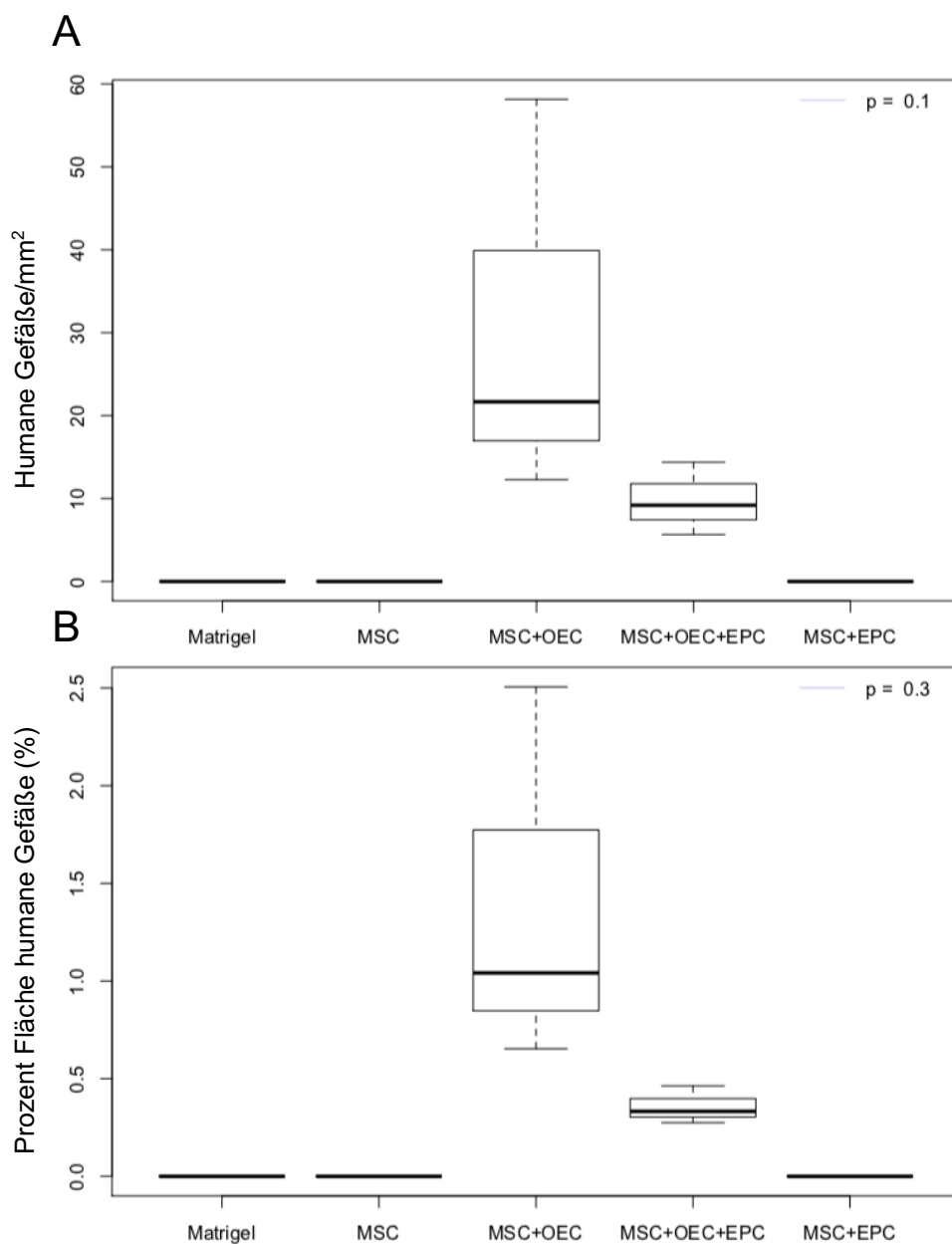


Abb. 10 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des zweiten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

3.1.2.3 Darstellung des Spendersets 4

Das vierte Spenderset zeigte eine größere Anzahl humaner Gefäßanschnitte pro mm² in der Triple-Injektion im Vergleich zur Co-Injektion. Sie unterschieden sich allerdings nicht statistisch signifikant. Bei dem prozentualen Anteil der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede darstellen (siehe Tab. 6 und Abb. 12). In der immunhistochemischen Färbung der Präparate konnte keine stärkere Expression von CD31 in der Triple-Applikation gegenüber der Co-Applikation gezeigt werden (siehe Abb. 11).

3.1.2.4 Darstellung des Spendersets 5

Die Anzahl humaner Gefäßanschnitte pro mm² sowie der prozentuale Anteil der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche zeigten sich bei dem fünften Spenderset in der Triple-Injektion gegenüber der Co-Injektion gesteigert. Sie wiesen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Tab. 7 und Abb. 14). Die Färbung mit dem endothelialen Marker CD31 fiel hierzu passend in der Triple-Applikation stärker aus (siehe Abb. 13).

3.1.2.5 Darstellung des Spendersets 6

In der Auswertung des sechsten Spendersets zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Anzahl an humanen Gefäßanschnitten pro mm² zugunsten der Triple-Applikation. Diese wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf. Auch der prozentuale Anteil der Fläche der humanen Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche war erhöht bei der Triple-Injektion gegenüber der Co-Injektion. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang (siehe Tab. 8 und Abb. 16). Außerdem war eine vermehrte Expression von CD31 in der Triple-Applikation gegenüber der Co-Applikation zu sehen (siehe Abb. 15).

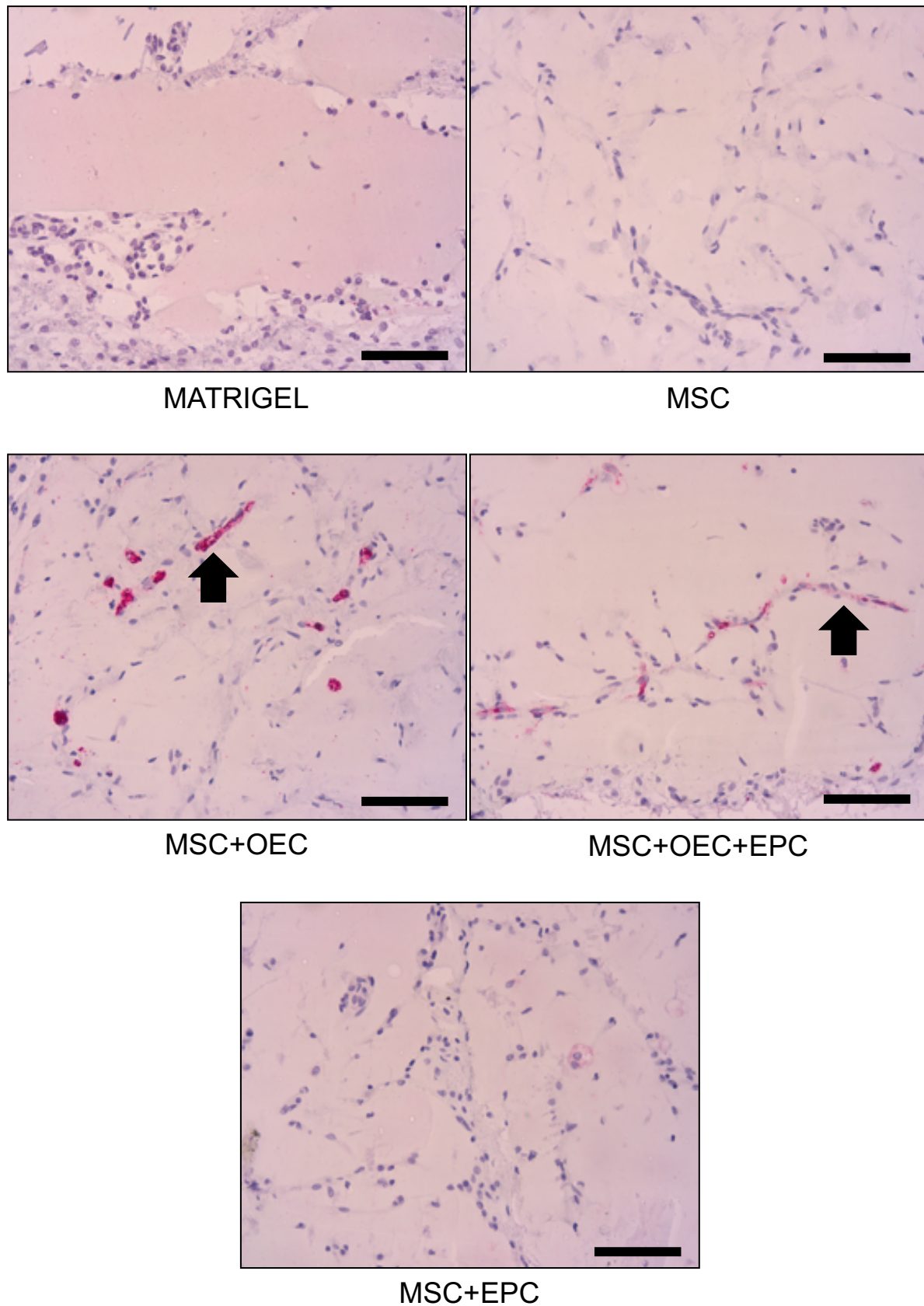


Abb. 11 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 4 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (↑) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m

	Matrigel [®]	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane Gefäße/mm²	0	0	24,06 (± 3,85)	29,30 (± 14,10)	0	0,8
Prozent Fläche humane Gefäße (%)	0	0	0,93 (± 0,56)	0,41 (± 0,20)	0	0,5

Tab. 6 - Anzahl humaner Gefäße pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 4. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.

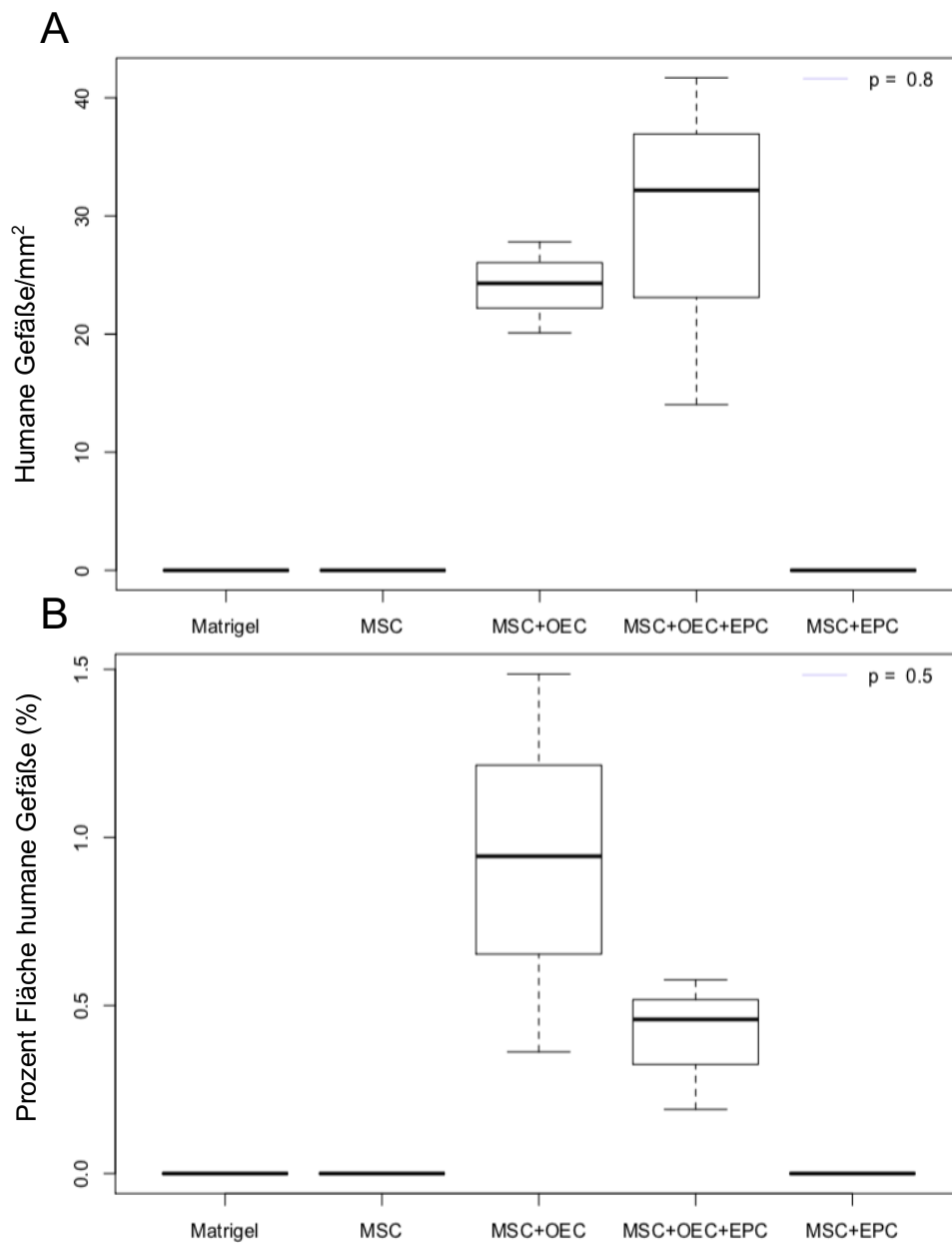


Abb. 12 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des vierten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

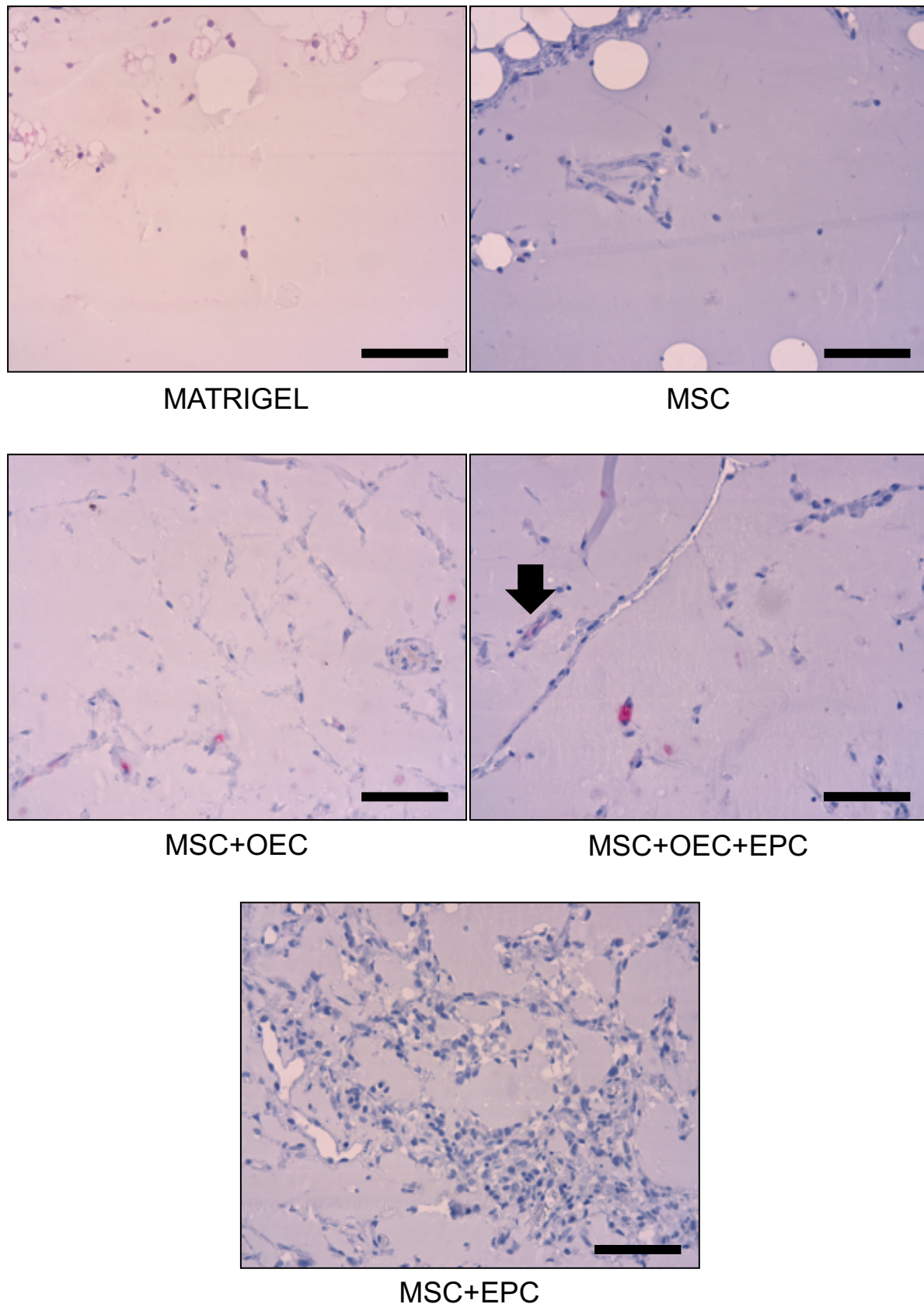


Abb. 13 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 5 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (\hat{I}) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m

	Matrigel [®]	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane GefäÙe/mm²	0	0	2,61 (\pm 1,03)	6,67 (\pm 1,22)	0	0,6
Prozent Fläche humane GefäÙe (%)	0	0	0,16 (\pm 0,03)	1,93 (\pm 0,88)	0	0,1

Tab. 7 - Anzahl humaner GefäÙe pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 5. Darstellung in Mittelwert \pm Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.

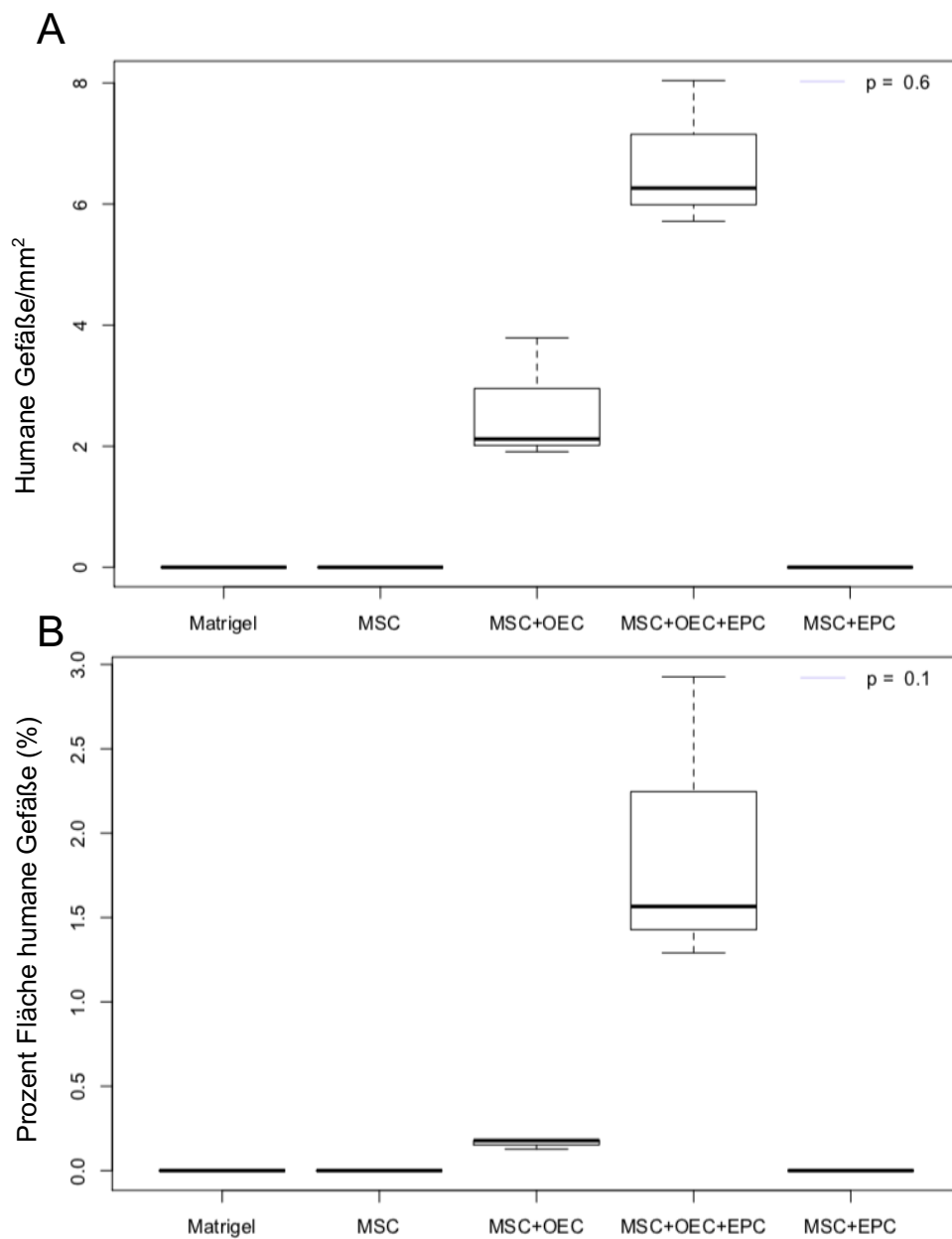


Abb. 14 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des fünften Spendersets mit Anzahl der humanen GefäÙanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

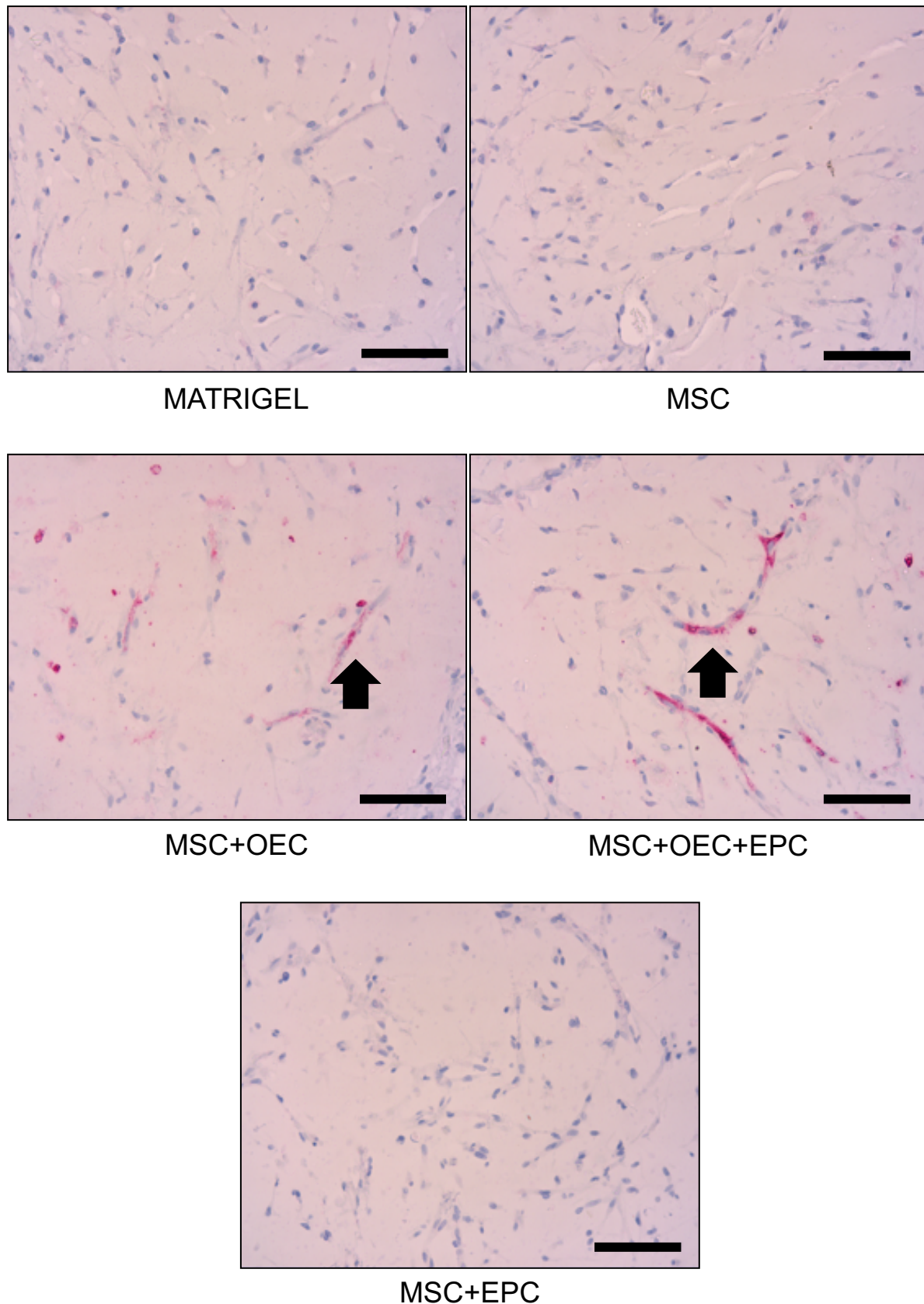


Abb. 15 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 6 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (\hat{I}) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m

	Matrigel	MSC	MSC+OEC	MSC+OEC+EPC	MSC+EPC	p-Wert
humane GefäÙe/mm²	0	0	4,04 (\pm 1,40)	13,63 (\pm 2,84)	0	0,9
Prozent Fläche humane GefäÙe (%)	0	0	1,45 (\pm 1,08)	1,74 (\pm 0,83)	0	0,05

Tab. 8 - Anzahl humaner GefäÙe pro mm² sowie Prozent der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 6. Darstellung in Mittelwert \pm Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.

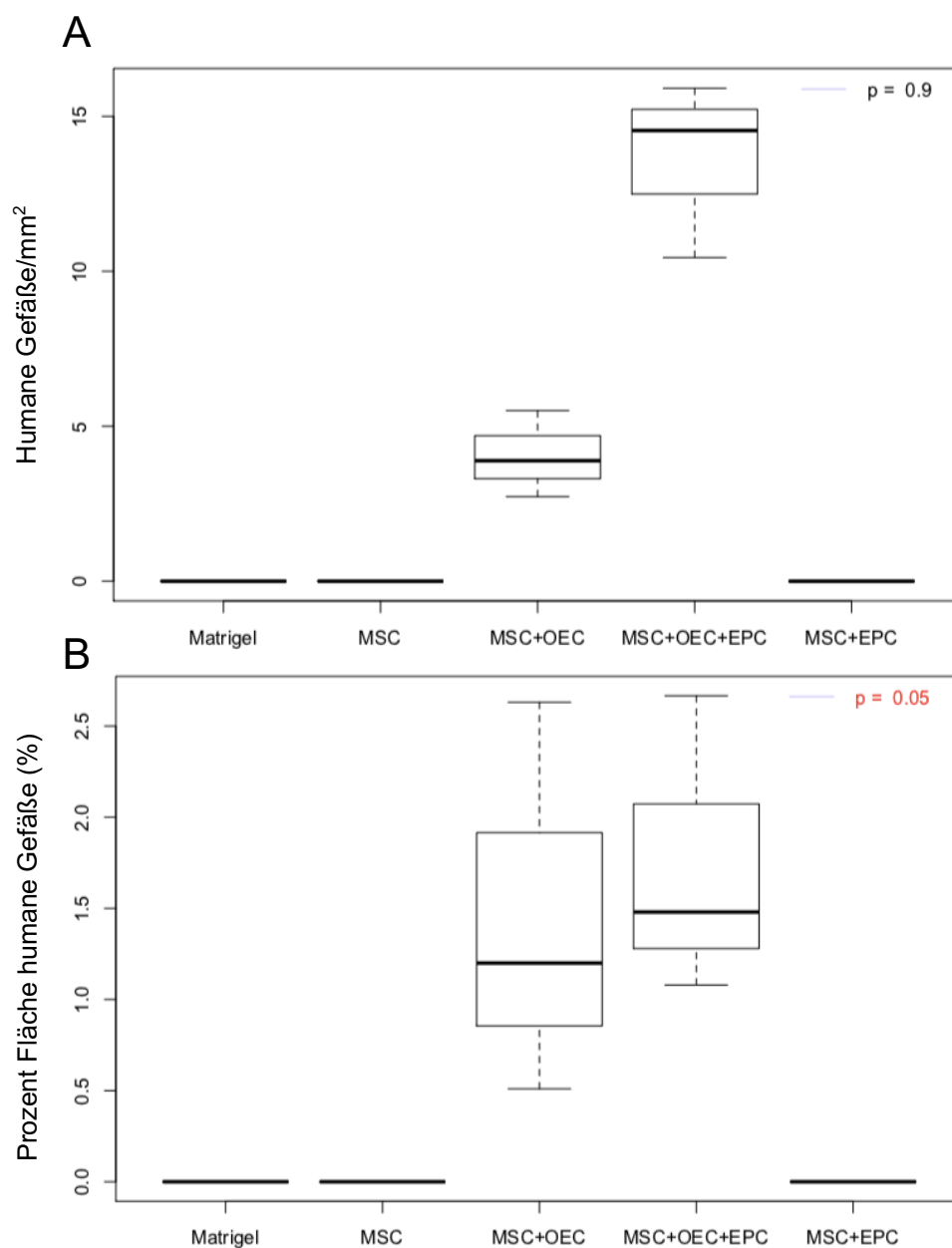


Abb. 16 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des sechsten Spendersets mit Anzahl der humanen GefäÙanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner GefäÙe an der Gesamtimplantationsfläche (B), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt.

4. Diskussion

4.1. Einfluss der myeloiden Zellen auf die Bildung angiogener Strukturen an der Gesamtheit aller Spender

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von EPC mit myeloiden Eigenschaften auf die Vaskularisierung mit Hilfe einer Applikation aus OEC, MSC und EPC *in vivo* untersucht werden. Hierbei sollte die Interaktion innerhalb der Zellgemische sowie deren Einfluss auf die Angiogenese nach subkutaner Implantation mit einem Hydrogel in einem Maus-Modell beobachtet werden. Die Auswertung erfolgte anhand histologischer Schnitte sowie immunhistochemischer Färbung.

Die Mittelwerte der Gesamtheit aller Spendersets dieser *in vivo* Studie legen keinen verstärkenden Einfluss der EPC auf die Angiogenese in der Triple-Injektion mit MSC, OEC und EPC gegenüber der Co-Injektion aus MSC und OEC zum Untersuchungszeitpunkt nach 14 Tagen nahe.

In der gemittelten histomorphometrischen Bildanalyse aller Spendersets zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Zugabe von EPC zu der Co-Injektion aus MSC und OEC und der Anzahl humaner Gefäßanschnitte pro mm² sowie dem prozentualen Anteil der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche nach 14 Tagen.

Bei der Co-Injektion aus MSC und EPC zeigte sich bei keinem der Spendersets eine Bildung humaner vaskulärer Strukturen, gleiches gilt für die Mono-Injektion aus MSC sowie die Kontrollgruppe mit Matrigel. Eine fehlende Bildung humaner vaskulärer Strukturen in der Co-Applikation aus MSC und EPC sowie Monoapplikation der MSC decken sich mit den *in vitro* Erkenntnissen von Shi et al. (43). Allerdings hatte in diesem *in vitro* Triple-Kultur-Modell aus MSC, OEC und EPC eine signifikante Verbesserung der Bildung prävasculärer Strukturen gegenüber der Co-Kultur aus MSC und OEC imponiert. Diese Verbesserung war in dieser Studie so nicht *in vivo* nachzuweisen.

Generell sind in der Literatur in *in vivo* Co-Injektions-Modellen im Vergleich zu unserem Triple-Injektions-Modell eher positive Einflüsse auf die Angiogenese gezeigt worden. Beispielhaft dient die Studie von Pedersen et al. Hier erfolgte zunächst eine *in vitro* Co-Kultivierung von MSC und Endothelzellen aus humanem Umbilikalvenenblut (HUVEC) auf einem poly-Scaffold, so dass initial angiogene Strukturen induziert wurden, um anschließend eine intramuskuläre *in vivo* Implantation dieses Scaffolds zur Verbesserung der Vaskularisierung durchzuführen (108). Im Vergleich zur

Kontrollgruppe wurde nach 3 Wochen eine höhere Dichte vaskulärer Gefäße in der Co-Injektion mit dem Scaffold gesehen. Eine der physiologischen Ursachen scheint hierbei eine verbesserte VEGF-Produktion der MSC unter Co-Applikation mit Endothelzellen zu sein.

Ma et al. (109) hatten ebenfalls die Bildung von humanen perfundierten, CD31-positiven vaskulären Strukturen *in vivo* in einem Versuchsaufbau mit initialer *in vitro* Co-Kultivierung von MSC und HUVEC und anschließender subkutaner Injektion mittels eines Hydrogels (Kollagengel) beschrieben. In den beiden beschriebenen Co-Injektionen wurden die HUVEC nach einiger Expansionszeit genutzt, so dass diese am ehesten späte endotheliale Progenitorzellen (late EPC (L-EPC), also OEC) darstellten.

Auch in Co-Applikations-Modellen unter Nutzung eines Scaffolds mit Aussaat von MSC und EPC *in vivo* konnten gegenüber der Mono-Applikation aus MSC oder EPC Verbesserungen der vaskulären Strukturen und damit auch der Knochenregeneration gezeigt werden (110,111).

Ein *in vivo* Modell von Eman et al. mit Triple- sowie Co-Applikationen aus MSC, OEC (L-EPC) und EPC (E-EPC (early-EPC)), welche jeweils aus Ziegenknochenmark bzw. peripherem Blut isoliert wurden, hatten nach subkutaner Implantation eine größere Anzahl Erythrozyten-perfundierter vaskulärer Strukturen sowie eine höhere Lumendichte in der Co-Injektion aus MSC und EPC gegenüber der Triple-Injektion und der Co-Injektion aus OEC und MSC gezeigt (112). Bei vergleichbaren Experimentalgruppen unterschieden sich zu unserem Versuchsaufbau die genutzten Zellzahlen bzw. Verhältnisse untereinander. Bei Eman et al. erfolgte in der Triple-Applikation eine Nutzung von jeweils 50% der Zellzahlen von OEC und EPC im Verhältnis zu den MSC. In der Co-Applikation aus MSC und EPC wurde ein Verhältnis von 1:1 gewählt. In unserem Versuchsaufbau erfolgte bei einem Verhältnis der MSC und OEC von 1:1 lediglich eine Zugabe der EPC von 10% der Gesamtzellzahl zur Co-Injektion; auch die genutzten Zellzahlen insgesamt waren in unserem Versuchsaufbau um das 10-fache höher. Zudem waren in beiden Versuchsaufbauten, unserem sowie bei Eman et al., die primäre Isolation der EPC sowie die Kriterien der Auswertung divergierend, jedoch nicht der zeitliche Ablauf der Explantation und damit nicht die Rahmenbedingungen der histologischen Analyse (14 Tage).

Auch wenn die größte Anzahl vaskulärer Strukturen in der Co-Applikation aus MSC und EPC gesehen wurde, konnten Eman et al. zeigen, dass die EPC (E-EPC) zu

einem frühen Zeitpunkt die Vaskularisierung induzieren, hingegen die OEC (L-EPC) eher zu einem späteren Zeitpunkt.

Diese Erkenntnis deckt sich mit den Daten aus der *in vitro* Triple-Kultur unserer Arbeitsgruppe von Shi et al., bei der ebenfalls Hinweise dafür gefunden wurden, dass die EPC die Vaskularisierung zu einem früheren Zeitpunkt bedingen. Außerdem kann dies mit unseren spender-individuellen Daten assoziiert werden, da hier ebenfalls der Beitrag der EPC in einem früheren Stadium der Vaskularisierung und auch bei Spendersets mit insgesamt geringerer Vaskularisierung manifest zu werden scheint.

4.2. Spendervariabilität

In der spenderindividuellen Darstellung der vorliegenden Studie zeigte sich bei den Spendersets 4, 5 und 6 eine größere Anzahl der Gefäßanschnitte pro mm² in der Triple-Injektion bei relativ geringer Anzahl der Gefäßanschnitte im Vergleich zu den Spendersets 1 und 2, welche sich allerdings nicht statistisch signifikant darstellten (siehe Tab. 6, Tab. 7 und Tab. 8).

Diese Spendervariabilität lässt sich auf verschiedene Faktoren zurückführen:

In jedem Teilversuch sind die MSC, OEC und EPC jeweils von drei unterschiedlichen Spendern isoliert worden. Diese Spender wiesen Unterschiede in Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand auf. Dies kann einen Einfluss auf die spenderindividuellen Ergebnisse haben, da sich die Zellen individuell im Hinblick auf ihre zeitliche Dynamik und ihr Verhalten im Versuchsaufbau unterscheiden.

So konnten Hill et al. zeigen, dass bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie oder Hypercholesterinämie im Vergleich zu gesunden Patienten weniger EPC im peripheren Blut zirkulieren (113). Hingegen wirkt sich eine medikamentöse Therapie der erhöhten Cholesterinspiegel mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern positiv auf die Anzahl der zirkulierenden EPC aus (114).

Dies sind nur zwei Beispiele dazu, wie der individuelle Gesundheitszustand und die tägliche Medikation der Spender auf die Anzahl der zirkulierenden EPC und damit vermutlich auch auf die Funktionalität durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellpopulation und somit auch auf die Ergebnisse einwirken können.

Zudem sind nicht nur die jeweiligen individuellen Unterschiede zwischen den Spendern zu beleuchten, sondern auch die Heterogenität der jeweils verwendeten Zellpopulationen.

Die mesenchymalen Stammzellen und die endothelialen Progenitorzellen sind keine homogenen Zellfraktionen. Wie bereits eingangs beleuchtet, sind die EPC eine sehr heterogene Zellpopulation. Eine Expression von myeloiden Markern wie CD11b, CD206 sowie CD68 finden sich ebenso wie eine Expression endothelialer Marker wie CD31 und vWF. Eine Charakterisierung der EPC ist mittels der exprimierten endothelialen und myeloiden Marker möglich, allerdings ist diese nicht ganz einheitlich definiert (36,43,64) und somit eine Differenzierung erschwert.

In einer Vorarbeit hatten Shi et al. eine Zusammensetzung der EPC über die jeweilig exprimierten Marker mittels Durchflusszytometrie dargestellt. Hierbei konnte anhand durchflusszytometrischer Parameter wie forward scatter und side scatter eine Einteilung in große und kleine Zellen erfolgen, bei denen vor allem die großen Zellen mit myeloiden Marker wie CD11b, CD68 und CD206 charakterisiert waren, so dass diese klar als M2-Makrophagen zu werten waren (43).

Die mesenchymalen Stammzellen hingegen sind Vorläuferzellen, die die Fähigkeit der Differenzierung in adipogene, chondrogene und osteoblastäre Zelllinien besitzen. Ein Fehlen von MSC-spezifischen Oberflächen-Markern macht es jedoch schwer, eine möglichst homogene Zellfraktion zu isolieren, so dass die isolierten Zellen individuell unterschiedliche Zusammensetzungen beinhalten können. Diese Unterschiede können somit die Eigenschaften der Gesamtpopulation beeinflussen (115).

Die Heterogenität der beiden Zelltypen wirkt sich somit durch die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften, Expressionsmuster und damit parakrinen Signalwege auf die Angiogenese und damit auch auf die Variabilität der Ergebnisse zwischen den unterschiedlichen Spendern aus.

Einen weiteren Anteil zu der Spendervariabilität tragen die im Modell genutzten Tiere bei. Die Verteilung der zirkulierenden Stammzellen als auch eine hiermit verbundene Initiierung der Angiogenese ist trotz der genetischen Züchtung der Mäuse unterschiedlich. Auch die jeweilige subkutane Injektion des Zell-Matrigel-Gemisches in die Nackenfalte der Mäuse kann hinsichtlich der Platzierung des Injektats und so auch unterschiedlicher vaskulärer Einsprossungsprozesse variieren.

Zusammenfassend zeigte sich bei den Spendersets 4, 5 und 6 die Anzahl der Gefäßanschnitte in der Triple-Applikation aus MSC, OEC und EPC am höchsten und daher liegt die Vermutung nahe, dass die EPC hier einen stärkeren Beitrag zur

Angiogenese leisteten als bei den Spendersets 1 sowie 2. Vor diesem Hintergrund sollte der Beitrag der EPC zur Angiogenese genauer beleuchtet werden.

4.3. Rolle der EPC als myeloide Zellen

Die EPC wirken in der Angiogenese mehrheitlich als akzessorische Zellen bzw. Helferzellen; sie sind vor allem durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren relevant und letztlich kann nur durch die Beteiligung von adulten Endothelzellen (hier: OEC) überhaupt eine relevante Bildung vaskulärer Strukturen bedingt werden.

Die Wirkung der EPC als akzessorische Zelle lässt sich möglicherweise durch das Verhalten als pro-angiogener Makrophage bzw. myeloide Zelle erklären.

Pro-angiogene Makrophagen, also M2-Makrophagen, spielen vor allem bei der Initiierung der Angiogenese durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren (siehe 1.6) eine große Rolle.

Gerade die Transdifferenzierung von M1- zu M2-Makrophagen ist durch deren unterschiedliche Eigenschaften essenziell für die Gefäßbildung.

Diese Transdifferenzierung war in Co-Kulturen aus MSC und Makrophagen verstärkt durch den Einfluss der MSC nachzuweisen (116). Zudem konnten He et al. eine mögliche Transdifferenzierung der Makrophagen auch in einer Co-Kultur mit adulten endothelialen Zellen mittels der Produktion von CSF-1 bzw. MCSF (Colony-stimulating factor 1 bzw. Macrophage colony-stimulating factor) nachweisen (117). Auch Shi et al. legten eine höhere Stabilität des M2-Phänotypen bei einer Präsenz von adulten endothelialen Zellen auf bioartifiziellen Geweben nahe (81).

Darüber hinaus zeigten sich M2-Makrophagen bei der Vaskularisierung vor allem assoziiert mit endothelial tip cells, welche sich am distalen Ende der entstehenden Gefäße befinden. Diese unterstützen gerichtetes Wachstum und waren vor allem hilfreich bei der Anastomosierung von zwei entstehenden vaskulären Strukturen, was letztlich die vaskuläre Komplexität steigerte (118). Zumindest in Teilen wird diese Fusion durch VEGF-C und den NOTCH-Signalweg vermittelt (119).

Als weiteres Beispiel, wie Makrophagen zur Angiogenese beitragen können, ist die von Willenborg et al. nachgewiesene gesteigerte VEGF-Expression in Anwesenheit von Makrophagen zu Beginn der Heilungsphase dermalen Wunden anzuführen (91). Zudem wird die frühe Phase der Gefäßbildung auch durch MMP-9 geprägt, welches spezifisch von Makrophagen (CD11b+ Zellen) sezerniert wird (120). Auch wird durch

MMP-9 eine Proliferation der MSC und eine damit einhergehende gesteigerte Produktion von VEGF impliziert (121).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass M2-Makrophagen essenziell für die frühe Phase nach der Induktion der Angiogenese sind. Dies deckt sich wiederum mit der Annahme der *in vitro* Ergebnisse, dass die EPC mit ihren myeloiden Eigenschaften am effektivsten die Induktion der Gefäßbildung zu einem frühen Zeitpunkt bedingen (43). Umgekehrt scheint dann zu einem späteren Zeitpunkt, also bei fortgeschrittener Vaskularisierung, der Effekt der EPC auf die Gefäßbildung durch die fehlenden, soeben angesprochenen Induktionen von z.B. MMP und VEGF nicht mehr maßgeblich zu sein.

Vor allem der Einfluss des VEGF auf die frühe Phase der Angiogenese konnte durch die Nutzung der bioaktiven Substanz Fucoidan in einem *in vitro* Co-Kultur-Modell mit MSC, welche im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden, gezeigt werden. Das Fucoidan hemmte die Bildung vaskulärer Strukturen durch Bindung des frei verfügbaren VEGF (78).

Zum Teil sind diese Schlussfolgerungen auf unsere Ergebnisse übertragbar, denn die Spendersets 4, 5 und 6 zeigten mehr Gefäßanschnitte in der Triple-Applikation gegenüber der Co-Applikation bei im Verhältnis zu den Spendersets 1 und 2 geringerer Gesamtgefäßanschnitte. In unserem Versuchsaufbau war allerdings lediglich eine Auswertung nach 14 Tagen möglich, so dass eine Begutachtung des Studiendesigns zur Erklärung der Ergebnisse unabdingbar erscheint.

4.4. Limitation des Studiendesigns

Die Auswertung nach 14 Tagen, die mittels histologischer Schnitte, immunhistochemischer Färbung mit einem murinen CD31-Antikörper sowie histomorphometrischer Bildanalyse erfolgte, ähnelt der Methodik anderer Studien (32,50,122,123). 14 Tage hatten sich sowohl für derartige Studien *in vitro* als auch *in vivo* als günstiger Zeitrahmen für die Gesamtbewertung der Angiogenese dargestellt. Wie bereits dargelegt, konnte aber in Studien gezeigt werden, dass der Beitrag der EPC eher zu einem früheren Zeitpunkt manifest wird und somit eine Beurteilung nach wenigen Tagen (max. 7 Tage) sinnvoller erscheint.

Gegenüber dynamischeren Modellen, die die Möglichkeit einer Auswertung zu mehreren Zeitpunkten gewähren, zeigte unser Modell mit der einfachen Auswertung nach 14 Tagen ein recht statisches Regime. So wäre eine zusätzliche Darstellung vor allem zu einem früheren, ggf. aber auch späteren Zeitpunkt und die damit verbundene zeitliche Evaluierung der Ergebnisse ein möglicher Ansatz für weitere Untersuchungen. Nichtsdestotrotz ist ein *in vivo* Modell mit mehreren Beobachtungszeiträumen aufgrund eines vermehrten Bedarfs an Tieren sowie einer deutlichen Zunahme der Zellzahlen, welche generiert werden müssten, mit Schwierigkeiten verbunden.

Die Färbung der Präparate erfolgte zur Auswertung mittels eines murinen CD31-Antikörpers. CD31 wird auf der Oberfläche sich entwickelnder oder adulter Endothelzellen exprimiert. Darüber hinaus wird CD31 aber teilweise auch von myeloiden Zellen, vor allem Makrophagen, exprimiert. Bildmorphologisch stellt sich eine Abgrenzung zwischen humanen EPC und murinen sowie humanen Makrophagen als schwierig dar. Gerade im Hinblick auf die Frage der Beteiligung myeloider Zellen an der Angiogenese wäre eine weitere Färbung mit einem myeloiden Marker sinnvoll. Eine Koexpression beider Marker könnte die Verbindung der myeloiden und endothelialen Charakteristiken innerhalb der Gruppe der EPC weiter hervorheben (124). Aus diesem Grund werden in der Arbeitsgruppe weitere Färbungen der vorliegenden histologischen Präparate dieser Studie mittels Makrophagen-Markern, CD163 und Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP), durchgeführt, um eine bessere Aussage treffen zu können. In ersten Ergebnissen zeigten sich bei den TRAP-Färbungen, welcher zur Darstellung von Osteoklasten genutzt werden kann und auch myeloide Zellen gut abbildet, insbesondere eine Allokation der myeloiden Zellen mit den humanen Gefäßen (siehe Abb. 17).

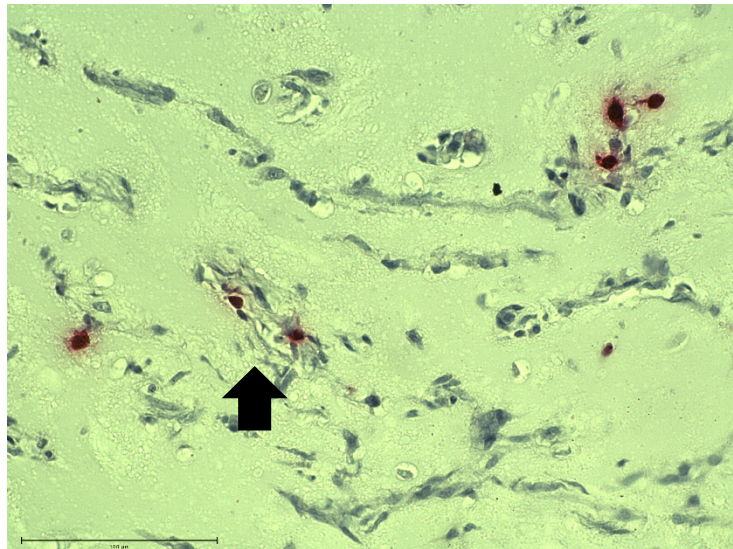


Abb. 17 - Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit TRAP der Experimentalgruppe MSC+OEC+EPC des Spendersets 2 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Färbung mit dem myeloiden Marker TRAP, hier in rot dargestellt. Beispielhaft kennzeichnet der schwarze Pfeil (\uparrow) Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m; aus der Arbeitsgruppe erhalten.

Auch die Methode der histomorphometrischen Analyse nach immunhistochemischer Färbung entspricht ähnlichen Studien (32,123,125). Doch ist die wichtige Darstellung der 3D-Architektur sowie der Blutgefäßperfusion in 2D (zweidimensional)-histologischen Schnitten schwer in seiner Komplexität und Quantität zu erreichen.

Um eine 3D-Darstellung zu ermöglichen, wurde in Studien zum einen die Möglichkeit einer Darstellung des Blutflusses und damit der Gefäßarchitektur mit Hilfe einer sonographischen Doppler-Bildgebung untersucht (126), zum anderen wurden weitere Techniken wie „IVIS“ (*in vivo* fluorescent imaging) und Intravitalmikroskopie durchgeführt, um eine 3D-Darstellung der Angiogenese zu erreichen (127).

Zusätzlich zu diesen Techniken zeigten weitere Studien die Möglichkeit einer intravaskulären Injektion eines Kontrastmittel-haltigen Gels, welches aushärtet und anschließend mit Hilfe eines μ CT eine quantitative Analyse der vaskulären Architektur ermöglicht (128,129).

Auch in diesem Zusammenhang soll innerhalb der Arbeitsgruppe eine weitere Versuchsreihe zur besseren Darstellung der *in vivo* Gefäßarchitektur in 3D mittels Kontrastmittel und μ CT verfolgt werden.

4.5 Fazit

Anhand der beschriebenen Faktoren lassen sich die Ergebnisse erklären, vor allem mit Blick auf die Spendervariabilität. Letztlich ist aufgrund der großen Variabilität der Donoren sowie der Heterogenität ihrer gespendeten Zellfraktionen eine Aussagekraft mit Blick auf die Gesamtheit aller Spender in der Frage des Einflusses der EPC auf die Angiogenese in der Triple-Injektion *in vivo*, auch aufgrund der Querschnittsanalyse nach 14 Tagen mit einfacher 2D-histologischer Aufbereitung und histomorphometrischer Analyse, erschwert.

Zusammenfassend lässt sich allerdings auf der Basis dieser Versuchsreihe und ihren Ergebnissen auch im Kontext anderer Studien sagen, dass bei einer hohen Vaskularisierungsrate bzw. einem späteren Zeitpunkt der Vaskularisierung kein bzw. nur ein geringer Beitrag der EPC zur Gefäßbildung vorhanden ist. Es zeigt sich jedoch bei Spendersets mit wenig Vaskularisierung und zu einem eher früheren Zeitpunkt der Angiogenese ein tendenziell positiver Einfluss der EPC auf die Angiogenese. Um eine weitreichendere Beurteilung möglich zu machen, sollten weitere *in vivo* Versuchsreihen mit Co- und Triple-Applikation in einem dynamischeren Modell im Sinne einer longitudinalen Auswertung erfolgen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit ist es, einen Beitrag zur weiteren Optimierung von Strategien zur Vaskularisierung bei Knochendefekten und den damit verbundenen verbesserten therapeutischen Optionen zu leisten. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Verwendung von EPC sowie OEC, isoliert aus dem peripheren Blut, und deren *in vivo* Co-Applikation mit MSC aus dem Knochenmark.

In neueren Studien wurde einerseits gezeigt, dass die Nutzung einer Co-Kultivierung von MSC, OEC und EPC *in vitro* einen pro-angiogenen Beitrag zur Gefäßbildung hat. Andererseits konnte auch der positive Einfluss von myeloiden Zellen auf die Angiogenese dargestellt werden. Des Weiteren wurde das Verhalten der EPC während der Vaskularisierung zum Teil als makrophagenähnlich beschrieben.

Daher wurde in dieser Studie der Einfluss von EPC als Quelle myeloider Zellen und ihr Verhalten auf die Vaskularisierung *in vivo* dargestellt. Hierfür wurden Triple- und Co-Applikationen mit der Trägermatrix Matrigel® in die Nackenfalte der Maus injiziert. Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen mittels immunhistochemischer Färbung gegen CD31 und histomorphometrischer Analyse.

In der Gesamtheit der Studie ließ sich statistisch keine Verbesserung der Gefäßbildung durch den Zusatz der EPC zur Co-Applikation aus MSC und OEC zeigen. In der nach Spendersets aufgeschlüsselten Auswertung war eine deutliche Varianz innerhalb der unterschiedlichen Spendersets in Bezug auf die Quantität der Gefäßanschnitte pro mm² zu erkennen. Diese lässt sich unter anderem auf die Heterogenität der EPC- und MSC-Populationen, die Heterogenität der Spender an sich sowie die unterschiedliche Wirkweise der jeweiligen Zelltypen zurückführen.

Abschließend lässt sich aufgrund der Spendervariabilität keine allgemeingültige Aussage zum positiven oder negativen Effekt von EPC auf die Gefäßbildung in Triple-Applikationen ableiten.

Die weitere Beobachtung des Verhaltens der EPC und damit der Einfluss auf die Angiogenese sind momentan Gegenstand weiterer Experimente der Arbeitsgruppe.

6. Literaturverzeichnis

1. Alexander Grimberg, Volkmar Jansson (Wissenschaftlicher Direktor), Thoralf Liebs, Oliver Melsheimer, Arnd Steinbrück. Jahresbericht 2016 - Endoprothesenregister Deutschland [Internet]. Verfügbar unter: https://www.eprd.de/fileadmin/user_upload/Dateien/Publikationen/Berichte/EPRD-Jahresbericht_2016_Einzelseiten_Online-Version.pdf
2. Knochenspende und -transplantation in Deutschland [Internet]. Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation. Verfügbar unter: <http://www.gewebenetzwerk.de/knochenspende-und-transplantation/>
3. Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ, u. a. Biotechnology and Bone Graft Substitutes. *Pharm Res.* 1. Oktober 1993;10(10):1393–401.
4. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury.* Mai 2007;38 Suppl 2:S11-18.
5. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 1. April 2001;10(4):1–4.
6. Lobo EG, Beaupré GS, Carter DR. Mechanobiology of initial pseudarthrosis formation with oblique fractures. *J Orthop Res.* 1. November 2001;19(6):1067–72.
7. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med.* Juni 2002;48(2):142–8.
8. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci.* 11. Januar 2010;10(1):12–27.
9. Seiler JG, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc.* 2000;9(2):91–7.
10. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA. Massive Allograft Use in Orthopedic Oncology. *Orthop Clin North Am.* 1. Januar 2006;37(1):65–74.
11. Pérez RA, Won J-E, Knowles JC, Kim H-W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1. April 2013;65(4):471–96.
12. S. Place E, H. George J, K. Williams C, M. Stevens M. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem Soc Rev.* 2009;38(4):1139–51.
13. Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 4. Juni 2009;15(3):353–70.
14. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive

- porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 1. Juni 2006;27(18):3413–31.
15. Ramay HR, Zhang M. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*. 1. August 2003;24(19):3293–302.
16. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. Juli 2001;101(7):1869–79.
17. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 1. Dezember 2012;64:18–23.
18. Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 1. Dezember 2007;28(34):5087–92.
19. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 1. November 2003;24(24):4337–51.
20. Eke G, Mangir N, Hasirci N, MacNeil S, Hasirci V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. *Biomaterials*. Juni 2017;129:188–98.
21. Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The Interplay of Dental Pulp Stem Cells and Endothelial Cells in an Injectable Peptide Hydrogel on Angiogenesis and Pulp Regeneration In Vivo. *Tissue Eng Part A*. 1. Februar 2015;21(3–4):550–63.
22. von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N. Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg*. August 2001;108(2):411–20; discussion 421-422.
23. Torio-Padron N, Baerlecken N, Momeni A, Stark GB, Borges J. Engineering of Adipose Tissue by Injection of Human Preadipocytes in Fibrin. *Aesthetic Plast Surg*. 1. Juni 2007;31(3):285–93.
24. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. Januar 2005;23(1):47–55.
25. Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandeburgh HH. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1. November 2002;283(5):C1557–65.
26. Zhu J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue

- engineering. *Biomaterials*. 1. Juni 2010;31(17):4639–56.
27. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. II. Modified Kroghian Models. *Biophys J*. 1. August 2001;81(2):685–96.
28. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular Response to Transforming Growth Factor- β 1 and Basic Fibroblast Growth Factor Depends on Release Kinetics and Extracellular Matrix Interactions. *J Biol Chem*. 22. November 1996;271(47):29822–9.
29. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol*. 1. November 2003;12(6):295–310.
30. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, u. a. Vascular Endothelial Growth Factor Gene-Activated Matrix (VEGF165-GAM) Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Large Segmental Bone Defects. *J Bone Miner Res*. 1. November 2005;20(11):2028–35.
31. Dvir T, Kedem A, Ruvinov E, Levy O, Freeman I, Landa N, u. a. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. September 2009;106(35):14990–5.
32. Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, u. a. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on in vivo vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 1. Februar 2009;30(4):526–34.
33. Thein-Han W, Xu HHK. Prevascularization of a Gas-Foaming Macroporous Calcium Phosphate Cement Scaffold Via Coculture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Osteoblasts. *Tissue Eng Part A*. August 2013;19(15–16):1675–85.
34. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, u. a. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Februar 2004;24(2):288–93.
35. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 29. März 2007;21(6):1141–9.
36. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. Januar 2009;13(1):87–102.
37. Fuchs S, Dohle E, Kolbe M, Kirkpatrick CJ. Outgrowth endothelial cells:

sources, characteristics and potential applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010;123:201–17.

38. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, u. a. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 28. November 2003;93(11):1023–5.

39. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, u. a. Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-Positive Cells for Functional Bone Healing. *Am J Pathol.* Oktober 2006;169(4):1440–57.

40. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood.* 1. April 2005;105(7):2783–6.

41. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, u. a. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1. Februar 2008;314(3):430–40.

42. Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials.* November 2006;27(31):5399–408.

43. Shi Y, Kramer G, Schröder A, Kirkpatrick CJ, Seekamp A, Schmidt H, u. a. Early endothelial progenitor cells as a source of myeloid cells to improve the pre-vascularisation of bone constructs. *Eur Cell Mater.* 25. Januar 2014;27:64–79; discussion 79-80.

44. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis.* 13. Februar 2017;1–12.

45. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25. Januar 2005;102(4):1076–81.

46. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 1. November 2004;231(3):474–88.

47. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function. *Physiology.* 1. April 2003;18(2):65–70.

48. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, u. a. Activation

- of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. September 1996;16(9):4604–13.
49. Wang L, Fan H, Zhang Z-Y, Lou A-J, Pei G-X, Jiang S, u. a. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. Dezember 2010;31(36):9452–61.
50. Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. September 2011;17(17–18):2199–212.
51. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 25. Februar 1983;219(4587):983–5.
52. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis. *Circ Res*. 22. Februar 2002;90(3):251–62.
53. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 1. April 2005;9(2):267–85.
54. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, u. a. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science*. 4. Juli 1997;277(5322):55–60.
55. Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update*. 1. September 2011;17(5):628–36.
56. Luttun A. Bone marrow-derived cells in angiogenesis and cancer. 23. Mai 2014; Verfügbar unter: <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/45053>
57. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1. Mai 2009;29(5):630–8.
58. van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor β signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1. April 2003;58(1):20–31.
59. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, u. a. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 14. Februar 1997;275(5302):964–7.
60. Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to

treatment. *Trends Cardiovasc Med*. Februar 2002;12(2):88–96.

61. Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):274–7.
62. Yoon C-H, Hur J, Park K-W, Kim J-H, Lee C-S, Oh I-Y, u. a. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 13. September 2005;112(11):1618–27.
63. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 4. März 2003;107(8):1164–9.
64. Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, u. a. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*. Dezember 2005;94(6):1270–9.
65. Fuchs S, Hofmann A, Kirkpatrick CJ. Microvessel-like structures from outgrowth endothelial cells from human peripheral blood in 2-dimensional and 3-dimensional co-cultures with osteoblastic lineage cells. *Tissue Eng*. Oktober 2007;13(10):2577–88.
66. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Allen P, Dudley AC, Klagsbrun M, Bischoff J. Host myeloid cells are necessary for creating bioengineered human vascular networks in vivo. *Tissue Eng Part A*. August 2010;16(8):2457–66.
67. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, u. a. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone*. 1. Oktober 2006;39(4):922–31.
68. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1. März 1998;16(2):155–62.
69. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. Juli 1998;80(7):985–96.
70. Bahney CS, Hu DP, Miclau T, Marcucio RS. The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. *Front Endocrinol*. 5. Februar 2015;6.
71. Nicola MD, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, u. a. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 15. Mai 2002;99(10):3838–43.
72. Ern C, Krump-Konvalinkova V, Docheva D, Schindler S, Rossmann O, Böcker W, u. a. Interactions of Human Endothelial and Multipotent Mesenchymal Stem Cells

- in Cocultures. *Open Biomed Eng J.* 11. Oktober 2010;4:190–8.
73. Guerrero J, Catros S, Derkaoui S-M, Lalande C, Siadous R, Bareille R, u. a. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* 1. September 2013;9(9):8200–13.
74. Duttenhoefer F, Lara de Freitas R, Meury T, Loibl M, Benneker LM, Hermann M, u. a. 3D scaffolds co-seeded with human endothelial progenitor and mesenchymal stem cells: evidence of prevascularisation within 7 days. *Eur Cells Mater ECM.* 29. August 2013;26:64–5.
75. Sun W, Motta A, Shi Y, Seekamp A, Schmidt H, Gorb SN, u. a. Co-culture of outgrowth endothelial cells with human mesenchymal stem cells in silk fibroin hydrogels promotes angiogenesis. *Biomed Mater Bristol Engl.* 7. Juni 2016;11(3):035009.
76. Loibl M, Binder A, Herrmann M, Duttenhoefer F, Richards Rg, Nerlich M, u. a. Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro., Direct Cell-Cell Contact between Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Induces a Pericyte-Like Phenotype In Vitro. *BioMed Res Int BioMed Res Int.* 2014;2014, 2014:395781–395781.
77. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadatzadeh MR, Mead LE, Prater DN, u. a. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mai 2009;296(5):H1675-1682.
78. Wang F, Schmidt H, Pavleska D, Wermann T, Seekamp A, Fuchs S. Crude Fucoidan Extracts Impair Angiogenesis in Models Relevant for Bone Regeneration and Osteosarcoma via Reduction of VEGF and SDF-1. *Mar Drugs.* 20. Juni 2017;15(6).
79. Ustyuzhanina NE, Bilan MI, Ushakova NA, Usov AI, Kiselevskiy MV, Nifantiev NE. Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology.* Dezember 2014;24(12):1265–74.
80. Luyt C-E, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, u. a. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* April 2003;305(1):24–30.
81. Shi Y, Wang F, Tiwari S, Yesilbas M, Steubesand N, Weitkamp J-T, u. a. Role

- of myeloid early endothelial progenitor cells in bone formation and osteoclast differentiation in tissue construct based on hydroxyapatite poly(ester-urethane) scaffolds. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. November 2016;34(11):1922–32.
82. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*. Februar 2005;105(4):1405–7.
83. Aplin AC, Fogel E, Nicosia RF. MCP-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. *Angiogenesis*. 1. September 2010;13(3):219–26.
84. Bellik L, Musilli C, Vinci MC, Ledda F, Parenti A. Human mature endothelial cells modulate peripheral blood mononuclear cell differentiation toward an endothelial phenotype. *Exp Cell Res*. 1. Oktober 2008;314(16):2965–74.
85. Hou J, Hou J, Peng X, Peng X, Wang J, Wang J, u. a. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell proliferation by secreting insulin-like growth factor-1. *Mol Med Rep*. 1. August 2017;16(2):1502–8.
86. Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, u. a. Tissue Engineering Strategies for Promoting Vascularized Bone Regeneration. *Bone*. Februar 2016;83:197–209.
87. James Kirkpatrick C, Fuchs S, Iris Hermanns M, Peters K, Unger RE. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*. 1. Dezember 2007;28(34):5193–8.
88. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, u. a. VEGF-Induced Adult Neovascularization: Recruitment, Retention, and Role of Accessory Cells. *Cell*. 13. Januar 2006;124(1):175–89.
89. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 1. März 2005;7(3):211–7.
90. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 3. März 2014;6.
91. Willenborg S, Lucas T, Loo G van, Knipper JA, Krieg T, Haase I, u. a. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 1. Januar 2012; blood-2012-01-403386.
92. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*. 28. Mai 2010;32(5):593–604.

93. De Palma M, Coussens LM. Immune Cells and Inflammatory Mediators as Regulators of Tumor Angiogenesis. In: Figg WD, Folkman J, Herausgeber. Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008. S. 225–37. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-0-387-71518-6_20
94. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. August 2008;8(8):618–31.
95. Ahn G-O, Seita J, Hong B-J, Kim Y-E, Bok S, Lee C-J, u. a. Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in myeloid cells promotes angiogenesis through VEGF and S100A8. *Proc Natl Acad Sci*. 18. Februar 2014;111(7):2698–703.
96. Kang K-T, Lin R-Z, Kuppermann D, Melero-Martin JM, Bischoff J. Endothelial colony forming cells and mesenchymal progenitor cells form blood vessels and increase blood flow in ischemic muscle. *Sci Rep*. 10. April 2017;7.
97. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, u. a. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*. 27. Mai 2010;115(21):4302–12.
98. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Kishi K, Suda T, Kubota Y. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood*. 12. Mai 2011;117(19):5264–72.
99. De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol*. Dezember 2007;28(12):519–24.
100. van der Pouw Kraan TCTM, van der Laan AM, Piek JJ, Horrevoets AJG. Surfing the data tsunami, a bioinformatic dissection of the proangiogenic monocyte. *Vascul Pharmacol*. Juni 2012;56(5–6):297–305.
101. Medina RJ, O’Neill CL, O’Doherty TM, Knott H, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, u. a. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Mol Med Camb Mass*. Oktober 2011;17(9–10):1045–55.
102. Giles FJ. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling Pathway: A Therapeutic Target in Patients with Hematologic Malignancies. *The Oncologist*. 10. Januar 2001;6(Supplement 5):32–9.
103. Chou J, Chan MF, Werb Z. Metalloproteinases: A functional pathway for myeloid cells. *Microbiol Spectr*. April 2016;4(2).

104. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, u. a. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 29. November 2012;120(23):4653–62.
105. Grellier M, Granja PL, Fricain J-C, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, u. a. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials*. 1. Juli 2009;30(19):3271–8.
106. Fuchs S, Hofmann A, Kirkpatrick CJ. Microvessel-like structures from outgrowth endothelial cells from human peripheral blood in 2-dimensional and 3-dimensional co-cultures with osteoblastic lineage cells. *Tissue Eng*. Oktober 2007;13(10):2577–88.
107. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res*. Oktober 2006;326(1):79–92.
108. Pedersen TO, Blois AL, Xue Y, Xing Z, Sun Y, Finne-Wistrand A, u. a. Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation. *Stem Cell Res Ther*. 17. Februar 2014;5(1):23.
109. Ma J, Yang F, Both SK, Prins H-J, Helder MN, Pan J, u. a. In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures. *Biofabrication*. 2014;6(1):015005.
110. Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I. Endothelial Progenitor Cells Improve Directly and Indirectly Early Vascularization of Mesenchymal Stem Cell-Driven Bone Regeneration in a Critical Bone Defect in Rats. *Cell Transplant*. 1. August 2012;21(8):1667–77.
111. Zigdon-Giladi H, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Co-Transplantation of Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Bone Regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(2):353–9.
112. Eman RM, Meijer HAW, Öner FC, Dhert WJA, Alblas J. Establishment of an Early Vascular Network Promotes the Formation of Ectopic Bone. *Tissue Eng Part A*. Februar 2016;22(3–4):253–62.
113. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, u. a. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med*. 13. Februar 2003;348(7):593–600.

114. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, u. a. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 1. August 2001;108(3):399–405.
115. Galderisi U, Giordano A. The Gap Between the Physiological and Therapeutic Roles of Mesenchymal Stem Cells. *Med Res Rev.* 1. September 2014;34(5):1100–26.
116. Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, Asher E, Loberman D, Raanani E, u. a. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* Januar 2013;18(1):78–86.
117. He H, Xu J, Warren CM, Duan D, Li X, Wu L, u. a. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood.* 11. Oktober 2012;120(15):3152–62.
118. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhij S, u. a. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood.* 5. August 2010;116(5):829–40.
119. Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, u. a. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol.* Oktober 2011;13(10):1202–13.
120. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, u. a. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell.* 31. Mai 2002;109(5):625–37.
121. Butoi E, Gan AM, Tucureanu MM, Stan D, Macarie RD, Constantinescu C, u. a. Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1. Juli 2016;1863(7, Part A):1568–78.
122. Ghanaati S, Fuchs S, Webber MJ, Orth C, Barbeck M, Gomes ME, u. a. Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med.* Juni 2011;5(6):e136-143.
123. Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, u. a. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials.* September 2010;31(27):6959–67.
124. Peebo BB, Fagerholm P, Traneus-Röckert C, Lagali N. Time-Lapse In Vivo

Imaging of Corneal Angiogenesis: The Role of Inflammatory Cells in Capillary Sprouting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1. Mai 2011;52(6):3060–8.

125. Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, Barbeck M, Orth C, Kirkpatrick JA, u. a. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials*. 1. November 2011;32(32):8150–60.

126. Phelps EA, Landázuri N, Thulé PM, Taylor WR, García AJ. Bioartificial matrices for therapeutic vascularization., *Bioartificial matrices for therapeutic vascularization*. *Proc Natl Acad Sci U S Am Proc Natl Acad Sci U S Am*. 23. Februar 2010;107, 107(8, 8):3323, 3323–8.

127. Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, u. a. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A*. Januar 2004;68(1):10–8.

128. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Guldberg RE. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1. Juli 2004;287(1):H302–10.

129. Duvall CL, Weiss D, Robinson ST, Alameddine FMF, Guldberg RE, Taylor WR. The Role of Osteopontin in Recovery from Hind Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1. Februar 2008;28(2):290–5.

7. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 - Die schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der Angiogenese und der wichtigsten molekularen Faktoren. 1. Die Initiierung der Angiogenese mit Degradierung der Basalmembran, 2. Die Formierung neuer vaskulärer Strukturen durch Migration, Aggregation und Differenzierung, 3. Stabilisierung und Reifung der neuformierten Gefäße; HIF-1: Hypoxie-induzierter Faktor 1, VEGF: vascular endothelial growth factor, MSC: mesenchymale Stammzellen, MMP: Matrixmetalloprotease, Ang-2: Angiopoetin-2, PDGF: platelet derived growth factor, Ang-1: Angiopoetin-1, TGF- β : transforming growth factor beta; EC: endotheliale Zellen; adaptiert und modifiziert nach Carmeliet et al. 2011 (55) und Lanttia 2014 (56) 7
- Abb. 2 - Darstellung des Einflusses der verschiedenen Faktoren und parakrinen Mechanismen auf die Proliferation und Differenzierung von MSC, OEC und EPC. Abkürzungen: MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1, Ang-1: Angiopoetin - 1, SDF-1: stromal cell-derived factor 1 , TGF- β : Transforming growth factor beta, , ET-1: Endothelin-1, MMP-9: Matrixmetalloprotease 9 (77,81–85)..... 11
- Abb. 3 - Quantifizierung von vaskulären Strukturen der Co-Kulturen mit EPC. Co-Kulturen mit MSC, OEC und EPC wurden, mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt, nach 4 Tagen (A) und 14 Tagen (B) dargestellt. Die Fläche (C) sowie die Länge der durch Co- und Triple-Kultur entstandenen vaskulären Strukturen (D) wurden nach 4 und 14 Tagen quantifiziert. Die statistische Signifikanz war definiert für einen p-Wert < 0,05. n=9 Proben, Skala: 100 μ m; entliehen von Shi et al. 2014 (43)..... 15
- Abb. 4 – Übersicht über den Versuchsaufbau, Skala: 100 μ m..... 16
- Abb. 5 - Prinzip der Isolation und Expansion von mononukleären Zellen bis zur Kultivierung von EPC und OEC 21
- Abb. 6 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse der Gesamtheit aller Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm² (A) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der

- Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 15 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 30
- Abb. 7 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 1 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielfhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (\uparrow) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m..... 32
- Abb. 8 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des ersten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm^2 (**A**) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 33
- Abb. 9 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 2 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielfhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (\uparrow) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 μ m..... 34
- Abb. 10 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des zweiten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm^2 (**A**) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 35
- Abb. 11 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 4 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen..... 37
- Abb. 12 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des vierten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm^2 (**A**) sowie des

- prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 38
- Abb. 13 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 5 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielfhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (↑) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 µm..... 39
- Abb. 14 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des fünften Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm² (**A**) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 40
- Abb. 15 - Immunhistochemische Färbung der Experimentalgruppen (Matrigel, MSC, MSC+OEC, MSC+OEC+EPC, MSC+EPC) des Spendersets 6 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Co- und Triple-Applikationen mit dem endothelialen Marker CD31 gefärbt und analysiert, hier in rot dargestellt. Beispielfhaft kennzeichnen die schwarzen Pfeile (↑) hier perfundierte Gefäßanschnitte. Skala: 100 µm..... 41
- Abb. 16 - Darstellung der mikroskopischen quantitativen Bildanalyse des sechsten Spendersets mit Anzahl der humanen Gefäßanschnitte pro mm² (**A**) sowie des prozentualen Anteils der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (**B**), jeweils nach 14 Tagen. n = 3 pro Gruppe. P-Werte mittels ANOVA bestimmt..... 42
- Abb. 17 - Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit TRAP der Experimentalgruppe MSC+OEC+EPC des Spendersets 2 nach 14 Tagen. Angiogene Strukturen konnten histologisch mittels eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Färbung mit dem myeloiden Marker TRAP, hier in rot dargestellt. Beispielfhaft kennzeichnet der schwarze Pfeil (↑) Gefäßanschnitte. Skala: 100 µm; aus der Arbeitsgruppe erhalten..... 50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 - Überblick über die Morphologie sowie weiterer Eigenschaften der EPC und OEC; Bilder im Rahmen der Arbeitsgruppe lichtmikroskopisch erhoben	9
Tab. 2 - Einteilung der Experimentalgruppen	23
Tab. 3 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 15 pro Gruppe.....	29
Tab. 4 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 1. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.	33
Tab. 5 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 2. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.	35
Tab. 6 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 4. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.	38
Tab. 7 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 5. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.	40
Tab. 8 - Anzahl humaner Gefäße pro mm ² sowie Prozent der Fläche humaner Gefäße an der Gesamtimplantationsfläche (%) nach 14 Tagen für Spenderset 6. Darstellung in Mittelwert ± Standardabweichung. P-Werte mittels ANOVA bestimmt, n = 3 pro Gruppe.	42

8. Veröffentlichungen

Paper

Wang F, Schmidt H, Pavleska D, Wermann T, Seekamp A, Fuchs S. Crude Fucoidan Extracts Impair Angiogenesis in Models Relevant for Bone Regeneration and Osteosarcoma via Reduction of VEGF and SDF-1. Mar Drugs. 20. Juni 2017;15(6).

Poster presentation

Wermann T, Gomell C, Lange L, Seekamp A, Barbeck M, Lippross S, Fuchs S The role of endothelial progenitor cells with myeloid characteristics in a subcutaneous in vivo vascularization model. TERMIS 26-29. Mai 2020, Manchester, UK

- Aufgrund der SARS-CoV-2-Pandemie verschoben

9. Danksagung

Meinen Dank möchte ich all jenen aussprechen, die mir diese Dissertation ermöglicht haben und mich an deren Gelingen unterstützten.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Andreas Seekamp danken, dem Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Er hat mir ermöglicht, die Dissertation in seiner Klinik durchzuführen und mich zur wissenschaftlichen Arbeit ermuntert.

Ich möchte Frau Prof. Dr. Sabine Fuchs, Leiterin der Klinik für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danken für die Möglichkeit einer experimentellen Forschung, der Überlassung des Themas sowie der engagierten und freundlichen Betreuung. Ihre vielen wegweisenden Einwände und Hilfen haben mich sehr motiviert und unterstützt.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Sebastian Lippross für die praktische Unterstützung und die Einbindung in den Tierversuch.

Ohne die Mitglieder der Arbeitsgruppe wäre diese Dissertation ebenfalls nicht möglich gewesen. Daher bin ich Frau Fanlu Wang, Frau Dijana Pavleska sowie Frau Anne-Marie Rosen zu Dank verpflichtet. Zudem möchte ich Dr. André Krath sowie Lisa Lange, Paula Zielhardt und Carolin Gomell danken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Mike Barbeck und seinem Team an der Sektion für Regenerative Orofaziale Medizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die Durchführung der Histologie und die histomorphometrische Analyse.

Außerdem möchte ich der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, mit dem Team rund um Prof. Dr. Gerhard Schultheiß danken.

Ich danke meinen Eltern und Freunden dafür, dass sie für mich da waren, mich motiviert und unterstützt haben.