

Aus dem Institut für chirurgische Forschung im
Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

und

der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**Effekte von Beschichtungen poröser Polyethylenimplantate
mit Extrazellulärmatrixkomponenten und VEGF
auf die mikrozykulatorische und mechanische Integration
*in vivo***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Weger
aus Landshut

2011

mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Strieth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Thomas

Prof. Dr. Günther Eißner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2011

I	EINLEITUNG.....	1
1.	Geweberekonstruktion durch „Tissue Engineering“.....	1
1.1	Grundlagen des „Tissue Engineering“.....	1
1.2	Angiogenese - Definition und Überblick.....	2
1.3	Angiogenese – Wachstumsfaktoren.....	3
1.4	Poröses Polyethylen als Biomaterial.....	6
2.	Fragestellung.....	7
II	MATERIAL UND METHODIK.....	8
1.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	8
2.	Verwendete Materialien und Substanzen.....	8
2.1	Implantatmaterial: Poröses Polyethylen.....	8
2.2	Beschichtungen.....	9
2.2.1	Extrazellulärmatrixkomponenten.....	9
2.2.2	Vascular Endothelial Growth Factor.....	10
3.	Tiermodell und Methoden.....	11
3.1	Das Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	11
3.1.1	Kammerpräparation.....	12
3.1.2	Implantation.....	13
3.1.3	Ausschlusskriterien.....	14
3.1.4	Makroskopische Dokumentation.....	14
3.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	15
3.2.1	Verwendete Fluoreszenzmarker.....	15
3.2.1.1	(FITC)-markiertes Dextran.....	15
3.2.1.2	Rhodamin 6G.....	15
3.2.2	Aufbau des intravitalemikroskopischen Arbeitsplatzes.....	16
3.2.3	Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Videobildanalyse.....	18
3.3	Messparameter.....	19
3.3.1	Mikrohämodynamische Parameter.....	19
3.3.2	Gefäßdurchmesser.....	20
3.3.3	Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	20
3.3.4	Funktionelle Gefäßdichte.....	20
3.4	Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	21
3.4.1	Leukozytenflux.....	21

3.4.2	Leukozytenadhärenz.....	21
3.5	Dynamische Desintegrationskraft.....	22
3.5.1	Aufbau der Messstation.....	22
3.5.2	Bestimmung der dynamischen Desintegrationskraft.....	22
4.	Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll.....	24
4.1	Versuchsgruppen.....	24
4.2	Versuchsprotokoll.....	24
5.	Darstellung der Ergebnisse und Statistik.....	25
III	ERGEBNISSE.....	26
1.	Angiogenese und Analyse der mikrohäodynamischen Messwerte.....	26
1.1	Gefäßdurchmesser.....	28
1.2	Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	29
1.3	Funktionelle Gefäßdichte.....	30
2.	Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	31
2.1	Leukozytenflux.....	31
2.2	Leukozytenadhärenz _{Gefäß}	31
3.	Dynamische Desintegrationskraft.....	32
IV	DISKUSSION.....	33
1.	Diskussion der Methodik.....	33
1.1	Das Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	33
1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.	Diskussion der Ergebnisse.....	36
2.1	<i>In vivo</i> -Untersuchung der mikrohäodynamischen Parameter.....	36
2.2	<i>In vivo</i> -Untersuchung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	37
2.3	Dynamische Desintegrationskraft.....	39
2.4	Ausblick.....	40
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	41
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	42

VII	ANHANG.....	52
	1. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	52
	2. Danksagung.....	53

Abkürzungsverzeichnis:

bFGF.....	basic Fibroblast Growth Factor
CAM assay.....	Chorionallantoic Membrane Assay
ECM.....	Extrazellulärmatrixkomponenten
EGF.....	Epidermal Growth Factor
EHS.....	Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkom
ERK.....	Extracellular-signal Regulated Kinasen
FGF.....	Fibroblast Growth Factor
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
GDP.....	Guanosindiphosphat
GFCM.....	Growth Factor Containing Matrigel
GFRM.....	Growth Factor Reduced Matrigel
IGF.....	Insulin-like Growth Factor
IVM.....	Intravitalmikroskopie
MAP.....	Mitogen-Activated Protein
NGF.....	Nerve Growth Factor
PDGF.....	Platelet-Derived Growth Factor
PLGA.....	Poly-D,L-Lactic-co-Glycolic Acid
PIGF.....	Placenta Growth Factor
PPE.....	Poröses Polyethylen
raf.....	rapidly growing fibrosarcoma
ras.....	rat sarcoma
ROI.....	Region of Interest
TGF.....	Transforming Growth Factor
VEGF.....	Vascular Endothelial Growth Factor

I EINLEITUNG

1. Geweberekonstruktion durch „*Tissue engineering*“

1.1 Grundlagen des „*Tissue engineering*“

Der Begriff *Tissue engineering*, der erstmals 1987 von der *National Science Foundation* definiert wurde, beschreibt ein „interdisziplinäres Arbeitsfeld, das Grundlagen aus dem Ingenieurwesen und der Naturwissenschaften zusammenführt mit dem Ziel, „einen biologischen Ersatz zu entwickeln, der die Funktion eines Gewebes wiederherstellen, bewahren oder verbessern kann“ (Langer & Vacanti, 1993). Da der Verlust oder der funktionelle Ausfall von Körpergewebe oder eines ganzen Organs ein wesentliches Problem bei vielen pathologischen Vorgängen ist (Laschke et al., 2006), könnte die Entwicklung von Verfahren, die es ermöglichen, verlorenes Gewebe wiederherzustellen oder sogar ganze Organe *de novo* zu erzeugen, zu einer zukunftsweisenden Schlüsseltechnologie werden. Insbesondere die zuweilen unbefriedigende Situation im Umgang mit ausgedehnten Gewebedefekten in der plastischen Wiederherstellungschirurgie könnte entscheidend verbessert werden.

Um einen solchen Ersatz aus speziell ausdifferenziertem Gewebe durch *In vitro*-Züchtung autologer Zellen herstellen zu können, wird meist ein dreidimensionales Grundgerüst verwendet. Dabei kann die dreidimensionale Struktur des Gerüsts nach Implantation einen Einfluss auf die Integrationsprozesse *in vivo* haben (Pinney et al., 2000). Gegenwärtig werden eine schnelle Vaskularisation und eine niedrige initiale Entzündungsreaktion als Hauptfaktoren für eine erfolgreiche Implantation solcher Zellgerüste angesehen (Laschke, Haufel et al., 2005).

Derzeit gibt es eine Vielzahl möglicher Ausgangsstoffe für eine solche Gerüststruktur, darunter auch resorbierbare, dreidimensionale Strukturen synthetischen wie auch natürlichen Ursprungs (Laschke et al., 2006). Aber auch nicht-resorbierbare poröse Materialien bieten die erforderlichen Eigenschaften wie Stabilität und Biokompatibilität. Dabei wurde in diversen Studien gezeigt, dass eine Porengröße unter 250 μm eine kritische Grenze für eine vollständige Vaskularisation darstellt (Druecke et al., 2004; Wake et al., 1994). Im Vergleich dazu bewegen sich Implantate aus porösem Polyethylen mit einer Porengröße von 100-200 μm (MEDPOR[®], Porex Surgical Inc., Newnan, GA, USA) zwar unterhalb dieses Grenzwertes, nichts desto trotz werden sie schon seit Jahren klinisch eingesetzt, um knöcherne sowie knorpelige kraniofaziale Defekte zu kompensieren (Berghaus, 1985; Berghaus et al., 1984; Berghaus & Stelter, 2006; Mendelsohn, 2005). Erfahrungsgemäß gibt es unterschiedlich gut

geeignete Implantatlokalisationen. Zu den letzteren zählt vor allem das Arbeitsfeld der plastischen und rekonstruktiven Nasenchirurgie (Berghaus & Stelter, 2006; Stelter et al., 2007). Bei Ohrrekonstruktionen konnten Operationstechniken, bei denen die Polyethylengerüste zur Ernährung mit lokoregionalen Lappen gedeckt wurden, die Erfolgsrate erhöhen (Romo & Reitzen, 2008).

Das Einwachsen von Bindegewebe in die Polyethylenimplantate wurde schon vor Jahren beobachtet (Berghaus, 1985). Dennoch sind auch derzeit die genauen Abläufe bei der Vaskularisation der Implantate noch nicht genau bekannt. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist vermutlich einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Angiogeneseinduktion. Unter Verwendung einer Gerüststruktur aus *poly-D,L-lactic-co-glycolic acid* (PLGA) konnte in Kombination mit Extrazellulärmatrix, die angiogenese-fördernde Wachstumsfaktoren enthält, bereits eine Beschleunigung der Implantatvaskularisation ohne den gleichzeitigen Verlust der Biokompatibilität erreicht werden (Laschke et al., 2008).

1.2 Angiogenese - Definition und Überblick

Angiogenese ist definiert als die von bestehenden Blutgefäßen ausgehende Bildung neuer Blutgefäße und stellt einen komplexen, dynamischen Prozess dar, der durch einen festen Ablauf voneinander abhängiger, humoraler und zellulärer Signale kontrolliert wird (Carmeliet, 2000; Risau, 1997). Erfolgt eine angiogene Stimulation, werden Gefäßendothelzellen aktiviert und beginnen, ihre umgebende Basalmembranmatrix durch Expression von Matrixmetalloproteinasen abzubauen. Die Endothelzellen wandern in das Interstitium, so entstehen luminäre Zellformationen und Gefäßstümpfe, sog. *vascular sprouts*. Endothelzellen beginnen zu proliferieren, so dass das neu entstehende Blutgefäß an Länge zunimmt (siehe Abb.1). Bei der Ausdifferenzierung der neuen Gefäßwände spielen weitere Zelltypen wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten, aber auch extrazelluläre Matrixkomponenten eine Rolle. Bestimmte lösliche Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren steuern diesen Prozess (Patan, 2004).

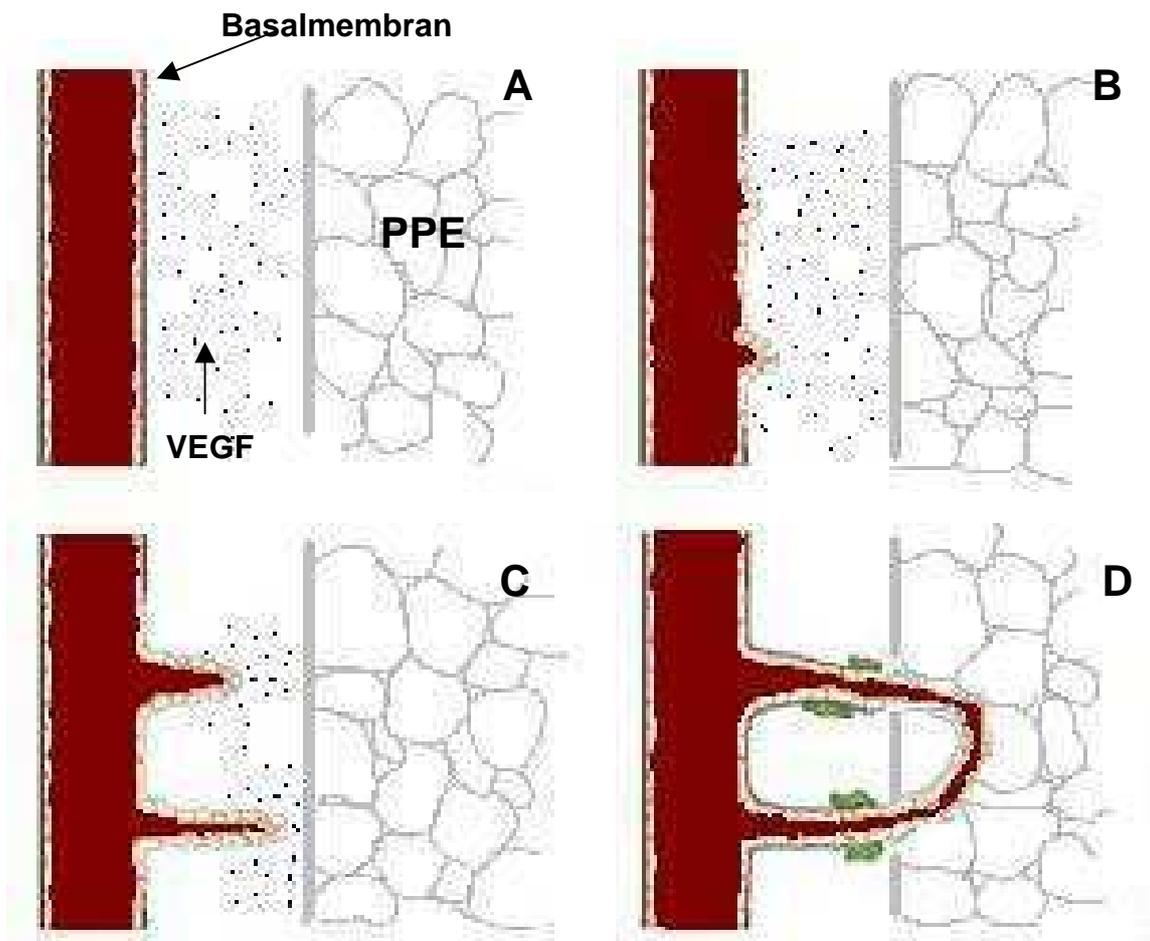


Abb. 1: VEGF-stimulierte Angiogenese am porösen Polyethylen-Implantat:

(A) Endothelzellen werden durch proangiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF aktiviert. (B) Proteinase (Kollagenasen, Plasminogen-Aktivator) bauen die Basalmembran des Blutgefäßes ab. (C) Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus. (D) Umhüllung der noch unreifen Blutgefäße mit einer Basalmembran und Perizyten.

1.3 Angiogenese - Wachstumsfaktoren

Der Mechanismus der Angiogenese wurde intensiv untersucht. Viele Regulatoren konnten identifiziert werden und liegen heute rekombinant vor. Sie können das Einwachsen von *tissue-engineertem* Ersatzgewebe unterstützen. Darunter sind *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) und unterschiedliche *Fibroblast Growth Factor*-Varianten (FGF-1 und FGF-2, (Norrby, 1997)). VEGF wird als einer der wichtigsten Stimulatoren der Neovaskularisation angesehen. Diesen Wachstumsfaktor gibt es

in fünf verschiedenen Isoformen (121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren), die an unterschiedliche Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Plasmamembran der Endothelzellen binden. Die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren führt in den Endothelzellen über den ras-raf MAP-Kinase-regulierten Signaltransduktionsweg zur Expression von Serinproteasen, Cysteinproteasen und Matrixmetalloproteasen und zur Bildung von spezifischen Integrinen auf der Oberfläche der Endothelzellen (s. Abb.2). Dies ermöglicht schließlich Proliferation und Migration dieser Zellen in Richtung des angiogenen Stimulus.

Eine systemische Gabe solcher Faktoren kommt nicht in Frage, da allzu große Proteinmengen erforderlich wären, um einen messbaren Effekt *in vivo* zu erzielen (Yancopoulos et al., 2000).

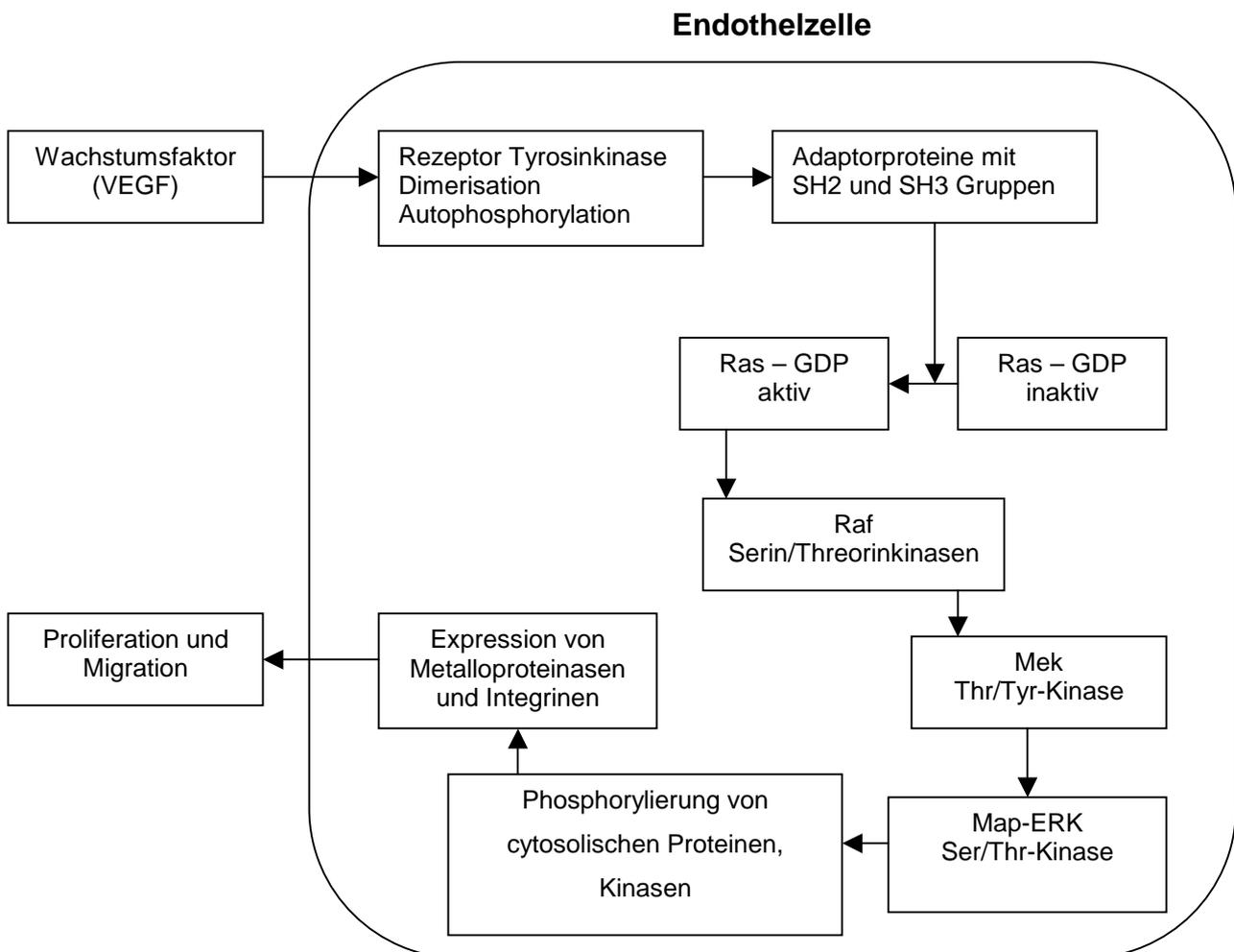


Abb.2: VEGF Stimulation einer Endothelzelle über den ras-raf MAP-Kinase Weg bei der Angiogeneseinduktion (GDP = Guanosindiphosphat; ERK = Extracellular-signal Regulated Kinasen)

Um solche Probleme zu vermeiden, erscheint die Strategie erfolgversprechender, die Wachstumsfaktoren in eine Gerüststruktur aus Biomaterial einzulagern. Dies führt zu einer prolongierten lokalen Freisetzung. Dieses Prinzip wurde bereits erfolgreich an einem Ulcus-Modell am Hasenohr angewandt (Pandit et al., 1998). Hierbei resultierte die Freisetzung von FGF-1 durch ein resorbierbares Fibrin- bzw. Kollagengerüst in einem verbesserten Heilungsprozess von Ulzera, die durch sämtliche Hautschichten reichten, wobei eine gesteigerte Angiogenese und eine bessere Epithelialisierung der Defekte gezeigt werden konnte. Bisher gibt es zwei häufig verwendete Möglichkeiten, Wachstumsfaktoren in ein Implantat zu integrieren. Die einfachere Methode besteht darin, die Wachstumsfaktoren mit Polymer-Partikeln zu mischen, bevor diese zu einer Gerüststruktur zusammengesetzt werden. Das Ergebnis ist eine schnelle Freisetzung der Faktoren innerhalb weniger Tage oder Wochen (Shea et al., 1999). Bei einem zweiten Lösungsansatz werden die Wachstumsfaktoren in sogenannte Mikrosphären verpackt. Dies sind Partikel von 1-100µm Durchmesser, die als Trägersubstanz nach ihrer Integration in das Implantatgerüst für eine kontinuierliche Freisetzung der Faktoren über eine länger andauernde Zeitspanne sorgen (Kedem et al., 2005; Perets et al., 2003; Tabata et al., 1999).

Richardson et al. kombinierten 2001 in einer Studie diese beiden Ansätze, um ein Polymergerüst zu entwerfen, das die Freisetzung von zwei oder mehreren Wachstumsfaktoren mit unterschiedlicher Kinetik erlaubt (Richardson et al., 2001). Mit Hilfe dieser Entwicklung konnten sie zeigen, dass die voneinander getrennte Ausschüttung von VEGF und PDGF zu einer raschen Bildung eines ausgereiften Gefäßnetzwerks innerhalb der Polymerstrukturen führte, wenn sie zuvor Ratten subkutan implantiert worden waren.

Neuere Modelle beschäftigen sich auch mit einem möglichen Gentransfer angiogener Wachstumsfaktoren in Zellen, die dann zusätzlich in eine Gerüststruktur integriert werden (Riabikhin et al., 2000). Hierbei soll *in vivo* eine kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren über eine bestimmte Zeitspanne erreicht werden. In der Vergangenheit wurde bereits eine regenerative Behandlung von Knochenschäden (Bonadio et al., 1999) und ischämiebedingten Gewebeschäden (Kasahara et al., 2003; Schwarz et al., 2000; Taniyama et al., 2001) untersucht, indem Plasmide mit Wachstumsfaktor-DNA zum Einsatz kamen. Trotzdem gibt es bis heute keine ausreichenden Erkenntnisse über nachteilige Effekte einer solchen Gentherapie und es ist nach wie vor nicht möglich, Expressionsmenge und -dauer exakt zu steuern. Demzufolge scheint bisher immer noch eine andersartig kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren sicherer und klinisch geeigneter als Verfahren auf der Basis von Gentransfers (Simons et al., 2000).

1.4 Poröses Polyethylen als Biomaterial

Poröse Polyethylen (PPE) -implantate werden bereits seit vielen Jahren klinisch erfolgreich zum Ersatz von Gewebedefekten eingesetzt (Berghaus, 1985; Lee et al., 2005; Mendelsohn, 2005). Sie erfüllen die Anforderungen, die an Biomaterialien gestellt werden (Yarlagadda et al., 2005): Sowohl *in vitro* wie *in vivo* konnte eine Integration und Vaskularisation nachgewiesen werden (Berghaus, 1985; Berghaus et al., 1984; Goldberg et al., 1994; Lee et al., 2005; Mendelsohn, 2005; Wellisz, 1993). Trotz der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten gibt es kritische Indikationen, so dass die Verwendung von PPE-Implantaten noch immer mit Risiken und Problemen verbunden ist. So kämpft man beispielsweise im Bereich der plastischen Nasenrekonstruktionen teilweise mit zu hohen Verlust- und Infektionsraten (Berghaus & Stelter, 2006; Stelter et al., 2007). Die genauen Gründe dafür sind bisher nicht bekannt, es wird aber eine unzureichende Deckung mit gut vaskularisiertem Gewebe als problematisch angesehen. Dementsprechend ist der klinische Einsatz derzeit erfolgreicher, wenn gestielte Lappen zur Deckung dieses Biomaterials verwendet werden, wie das zum Beispiel bei der Ohrmuschelrekonstruktion nach Berghaus erfolgte (Berghaus et al.; Braun et al.).

Aber auch neue Methoden und Erfolge im Bereich des „*Tissue engineering*“ könnten den Einsatz dieses Biomaterials verbessern. Die mikrovaskuläre Integration von Biomaterialien durch Angiogenese, der Einfluss der initialen Entzündungsreaktion und die Rolle von Wachstumsfaktoren auf den Heilungsverlauf wurden bereits von einigen Studien untersucht (Carmeliet, 2000; Karayiannakis et al., 2003; Mohle et al., 1997; Norrby, 1997; Shaw et al., 2003). Seit Jahren wird versucht, die Biokompatibilität der verwendeten Materialien zu verbessern und eine schnellere Integration in das umliegende Gewebe zu erreichen. Dabei fand man heraus, dass zum einen das verwendete Material (Goldberg et al., 1994; Menger, Walter et al., 1990), aber auch die dreidimensionale Struktur, wie z.B. die Porengröße des Implantatgerüsts, eine entscheidende Rolle spielen (Druecke et al., 2004; Goldberg et al., 1994; Menger, Hammersen et al., 1990; Menger, Walter et al., 1990; Wake et al., 1994).

Die zusätzliche Verwendung von Wachstumsfaktoren ergab in Studien mit PLGA-Implantaten schnellere Einheilzeiten bei gleichbleibender Biokompatibilität. Die dabei verwendete Basalmembranmatrix MatrigelTM (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) enthält neben vielen weiteren Wachstumsfaktoren *VEGF* (Laschke et al., 2008). Aber auch frühere Studien von Bigham et al. zeigten bereits einen erfolgreichen Einsatz von Wachstumsfaktoren bei der Verwendung von Biomaterialien (Bigham et al., 1999).

2. Fragestellung

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte in der vorliegenden experimentiellen Studie untersucht werden, ob Implantate aus porösem Polyethylen (Medpor[®], Porex Surgical Inc., Newnan, USA) nach Beschichtung mit einer Extrazellulärmatrix (ECM, BD Matrigel[™] GFR; BD Biosciences, San Jose, California, USA) mit unterschiedlich hoher VEGF-Konzentration Einfluss auf die Biokompatibilität des Materials haben. Ziel war dabei die Analyse der mikrohämodynamischen Integration, die Messung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion und deren Einfluss auf den Einheilungsprozess auch unter Berücksichtigung der mechanischen Integration der Implantate in das umgebende Gewebe.

Hierfür wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Welchen Einfluss hat die Beschichtung der Polyethylenimplantate mit ECM und VEGF auf die mikrovaskuläre Integration *in vivo*?
- 2) Hat die Beschichtung von porösen Polyethylenimplantaten mit ECM und VEGF einen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion *in vivo*?
- 3) Welche Auswirkung hat die Beschichtung poröser Polyethylenimplantate mit Extrazellulärmatrixkomponenten und VEGF auf die mechanische Integration der Implantate in das umgebende Gewebe?

II MATERIAL UND METHODIK

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Genehmigung der Regierung Oberbayern im Zeitraum von August 2006 bis September 2008 am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (WBex) durchgeführt.

1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche C57/Bl6 Mäuse ab einem Alter von 6 Wochen und einem Körpergewicht von 25g aus dem Zuchtprogramm der Firma *Charles River* (Sulzfeld, Deutschland). Bei einer konstanten Raumtemperatur von 24° C, einer Luftfeuchtigkeit von 50% und Beleuchtung durch Kunstlicht in einem alle 12 Stunden wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus wurden jeweils 6 Tiere pro Käfig im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter (Sniff; Spezialdiäten GmbH, Soest).

Nach Präparation der Rückenhautkammer erfolgte die Unterbringung der Tiere für den weiteren Verlauf in Einzelkäfigen unter den zuvor beschriebenen konstanten Umgebungsbedingungen in einem separaten Tierstall für chronische Versuchsreihen.

2. Verwendete Materialien und Substanzen

Im Rahmen der Versuche kamen folgende Materialien und Substanzen zum Einsatz:

2.1 Implantatmaterial: Poröses Polyethylen

Als Implantatmaterial wurde poröses Polyethylen (MEDPOR[®], Firma Porex Surgical, Inc., Newnan/GA, USA) mit einer durchschnittlichen Porengröße von 100-200 µm verwendet (s. Abb. 3). Ausgehend von Implantatblättern der Größe 76 x 50 x 0,25mm wurden für die Versuche quadratische Implantate mit 3mm Kantenlänge zugeschnitten und erneut dampfsterilisiert (134° C, 2 bar, >3min).

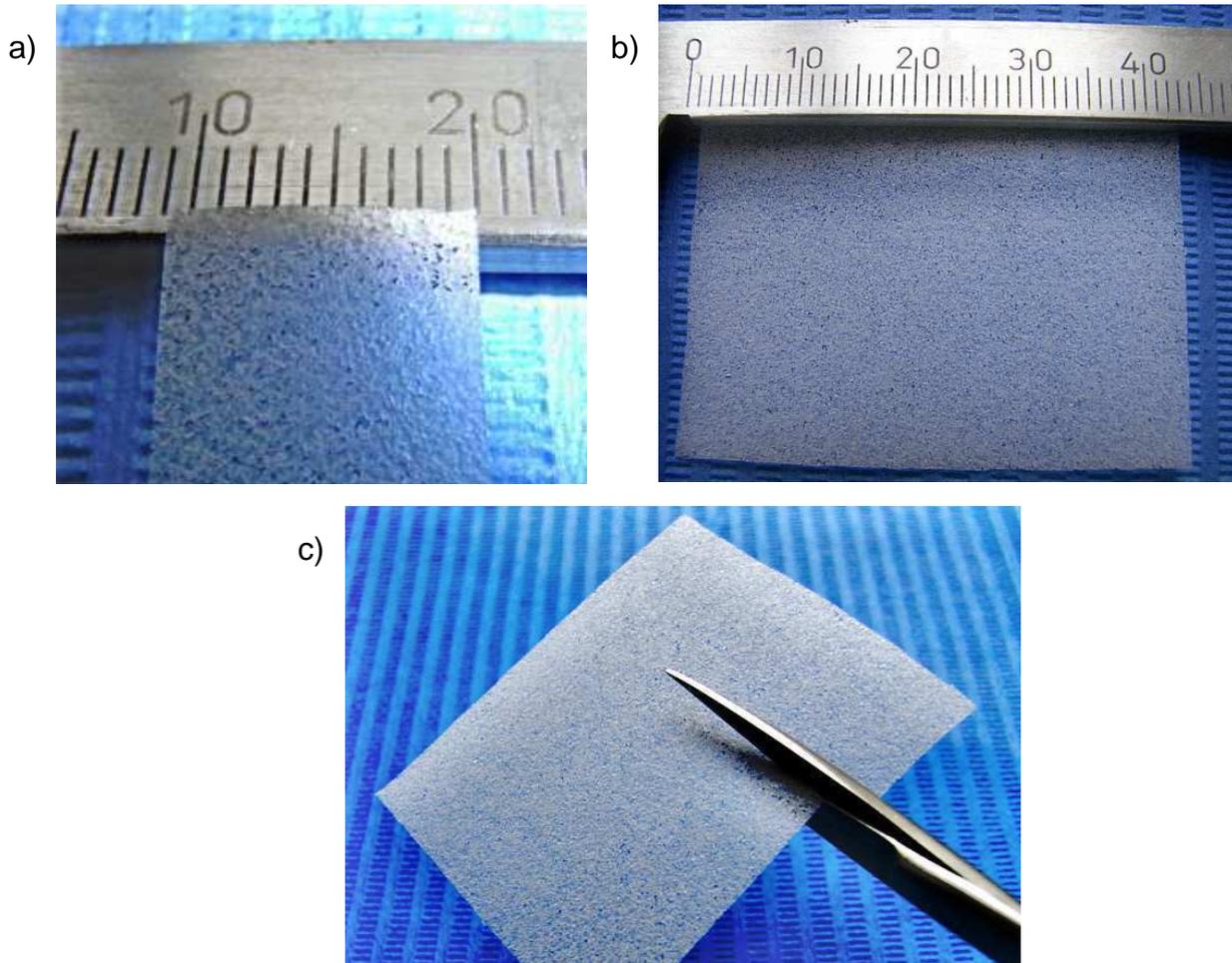


Abb. 3: Das verwendete Polyethylen besitzt eine Porengröße von 100-200 μm (a) . Die Membran (b) hat eine Dicke von 0,25 mm und kann einfach auf gewünschte Größen und Formate zugeschnitten werden (c).

2.2 Beschichtungen

2.2.1 Extrazellulärmatrixkomponenten

Matrigel™ Basalmembranmatrix (BD Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced, GFR, BD Biosciences, Heidelberg) besteht aus Extrazellulärmatrixkomponenten, die aus dem *Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkom (EHS)* extrahiert werden, das reich an extrazellulären Matrixproteinen ist. Die Membranmatrix in Gelform besteht vor allem aus Laminin (61%), Kollagen Typ IV (30%), Entactin (7%) und weiteren Wachstumsfaktoren (s. Abb. 4). In den Versuchsreihen wurde eine Basalmembranmatrix mit reduziertem Wachstumsfaktoranteil (GFR = Growth Factor Reduced) verwendet.

	GFRM	GFCM	GFRM + VEGF
Extrazellulärmatrixkomponenten * (%)			
Laminin	60	56	60
Kollagen IV	30	31	30
Entactin	7	8	7
Konzentrationen von Wachstumsfaktoren			
VEGF (ng/mL)	1,25	6	1000
PDGF (pg/mL)	<5	12	<5
EGF (ng/mL)	<0,5	0,7	<0,5
IGF-1 (ng/mL)	5	16	5
TGF- β (ng/mL)	1,7	2,3	1,7
NGF (ng/mL)	<0,2	keine Angabe	<0,2

VEGF = vascular endothelial growth factor; PDGF = platelet-derived growth factor; EGF = epidermal growth factor; IGF-1 = insulin-like growth factor; TGF- β = transforming growth factor; NGF = nerve growth factor; bFGF = basic fibroblast growth factor

***in der vorliegenden Studie wurden GFRM und GFRM + VEGF verwendet**

Abb.4: Zusammensetzung der Extrazellulärmatrixkomponenten und durchschnittliche Konzentration von Wachstumsfaktoren in Growth Factor Reduced Matrigel (GFRM) und dem mit VEGF angereicherten Matrigel (GFRM + VEGF) welche in dieser Studie zum Einsatz kamen, sowie dem ebenfalls erhältlichen Growth Factor Containing Matrigel (GFCM), (BD MatrigelTM Matrix Growth Factor Reduced, GFR, BD Biosciences, Heidelberg)

2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor

Unter den zahlreichen an der Angiogenese beteiligten Wachstumsfaktoren kommt der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) - Familie eine große Bedeutung bei Wachstum, Vitalität und Proliferation von Endothelzellen zu.

Hierbei wurden sechs strukturell unterschiedliche Formen (VEGF A-F sowie PlGF = Placenta Growth Factor) zusammengefasst. Eine erhöhte Expression von VEGF-A wird beispielsweise bei einer Reihe von Tumoren beobachtet, so dass die Faktorwirkung eine wichtige Rolle im Rahmen neuer antiangiogenetischer Therapiestrategien spielt.

In einer der untersuchten Gruppen wurden die Polyethylenimplantate mit einer Kombination von VEGF und der unter 2.2.1 beschriebenen Extrazellulärsubstanzmatrix vor deren Implantation in die Rückenhautkammer beschichtet (siehe auch 4.2).

3. Tiermodell und Methoden

3.1 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Um eine gute Visualisierung und Analyse der Neoangiogenese bei der mikrovaskulären Integration der porösen Polyethylenimplantate *in vivo* zu realisieren, wurde das Tiermodell der von Endrich und Mitarbeitern entwickelten transparenten Rückenhautkammer angewendet (Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1980). Hierbei wird ein Titangestell verwendet, das aus zwei gleichen Hälften mit je einer zentralen kreisrunden Öffnung von ca. 15 mm Durchmesser besteht, die als Beobachtungsfenster dient. Dieses kann mit Hilfe eines Deckglases (Durchmesser 11,8 mm, Stärke 1 mm; Edgar Hefele Medizintechnik, München) und eines Sprenglings verschlossen werden. Somit ist auch nach Kammerpräparation jederzeit ein Zugang zum beobachteten Gebiet z.B. für die Implantation des Polyethylen-Materials möglich (s. Abb. 5).

Über Distanzscheiben wird der Abstand der beiden Kammerhälften von 4 mm sichergestellt, um eine Kompression und eine daraus resultierende Ischämie des Gewebes zu vermeiden. Entlang des oberen sowie des unteren Randes des Titangestells befinden sich Bohrlöcher zur Fixierung der Kammer an der Rückenhaut der Mäuse mittels Schrauben und Nähten. Das Gesamtgewicht der Rückenhautkammer inklusive Deckglas, Sprengling und Fixierungsschrauben beträgt 4 g.



Abb. 5: Das Modell der transparenten Rückenhautkammer an der C57/Bl6 Maus (Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993)

3.1.1 Kammerpräparation

Um einen reibungslosen Ablauf der Kammerpräparation zu gewährleisten, wurden die Kammern zunächst auf ihre exakte Passung und Parallelstellung der beiden Kammerhälften überprüft. Jeweils eine Kammerhälfte wurde mit den drei zur Fixierung angebrachten Schrauben und Distanzmuttern bestückt, während das zentrale Beobachtungsfenster einer Seite mit einem Deckglas verschlossen wurde (siehe 3.1). Gemeinsam mit den Instrumenten wurden die so vorbereiteten Titankammern sterilisiert (134° C, 2 bar, >3min).

Während der gesamten Dauer der Kammerpräparation wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Gabe von 75 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia GmbH, Erlangen) und 25 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun[®], Bayer, Leverkusen) narkotisiert. Nach Narkotikainjektion in den Oberschenkel der Maus und Eintritt der Narkosewirkung wurden die Rückenhaare mit Hilfe eines Langhaarrasierers und einer Enthaarungscreme (Pilca MED[®] Enthaarungscreme, Asid Bonz GmbH, Bieblingen) vollständig entfernt und das depilierte Hautareal mit 72% Alkohol (Cutasept[®]; Bode Chemie, Hamburg) gereinigt. Um ein Auskühlen der Tiere während der Operation zu vermeiden, wurden diese auf einer Wärmeplatte gelagert. Die Präparation der Kammer erfolgte im Anschluss bei allen Tieren einheitlich auf der linken Flanke.

Hierzu wurde zunächst durch mittiges Anheben der Rückenhaut eine Hautfalte gebildet und durch Transillumination die Gefäßversorgung lokalisiert. Ziel war es, die Hautfalte so zu verschieben, dass eine Präparation der Kammer unter Schonung der großen Gefäßarkaden der linken und rechten A. costalis durchgeführt werden konnte. Sodann erfolgte eine Fixierung der optimalen Position mittels zweier Haltefäden (Ethibond[®] Excel 5/0; Ethicon, Norderstedt), das Annähen des Oberrandes der mit den Fixierschrauben versehenen Kammerhälfte an der dem Operateur abgewandten Seite der Rückenhaut und das Durchführen der beiden unteren Fixierschrauben durch zwei Stichinzisionen. Ebenfalls durch Transillumination konnte nun die für das Beobachtungsfenster vorgesehene Aussparung auf der zugewandten Hautseite mit einem wasserfesten Stift eingezeichnet werden. Das Tier wurde nun im Folgenden auf der Seite der fixierten Kammerhälfte gelagert, die eingezeichnete Fläche zeigte nach oben.

Die gesamte Präparation des Kammerfensters erfolgte unter 25-facher Vergrößerung (Wild M650; Wild AG, Heerbrugg, Schweiz) und Verwendung mikrochirurgischer Instrumente. Dabei wurde mit einer möglichst atraumatischen Präparationstechnik im gekennzeichneten Gebiet die Dermis einschließlich des subkutanen Bindegewebes entfernt, so dass der Hautmuskel der Gegenseite mit den versorgenden Gefäßen freilag, der mit NaCl 0,9%

befeuchtet wurde, um ein Austrocknen des Präparationsgebiets zu vermeiden. Abschließend wurde die zweite Kammerhälfte auf die Schrauben der Gegenseite gesetzt. Durch Adhäsionskräfte legte sich das befeuchtete Präparationsgebiet an das Deckglas an. Das Einsetzen des Sprenglings verschloss die Präparation. Die Fixationsschrauben wurden durch Muttern gesichert und die gesamte Kammer durch Einzelknopfnähte an der Rückenhaut fixiert.

3.1.2 Implantation

Die Implantation der 3 x 3 x 0,25 mm großen Polyethylen -Plättchen erfolgte zwei Tage nach der Kammerpräparation. Dazu wurden die wachen Versuchstiere in luftdurchlässigen Plexiglasröhren (Effenberger, München) auf einer speziellen Plexiglasbühne (Effenberger, München) immobilisiert. Die Kammer ragte dabei durch eine Bohrung aus der Röhre heraus und kam um 90° gekippt unter dem Operationsmikroskop zu liegen. Nach Oberflächendesinfektion des Deckglases mit 72% Alkohol (Cutasept®; Bode Chemie, Hamburg) und Entfernen des Sprenglings konnte das Glas vorsichtig abgehoben werden und das Implantat mit Hilfe einer mikrochirurgischen Pinzette auf den freiliegenden Hautmuskel gesetzt werden. Danach wurde die Kammer wieder mit einem neuen sterilen Deckglas und zugehörigem Sprengling verschlossen und mikroskopisch auf Unversehrtheit überprüft (s. Abb 6).

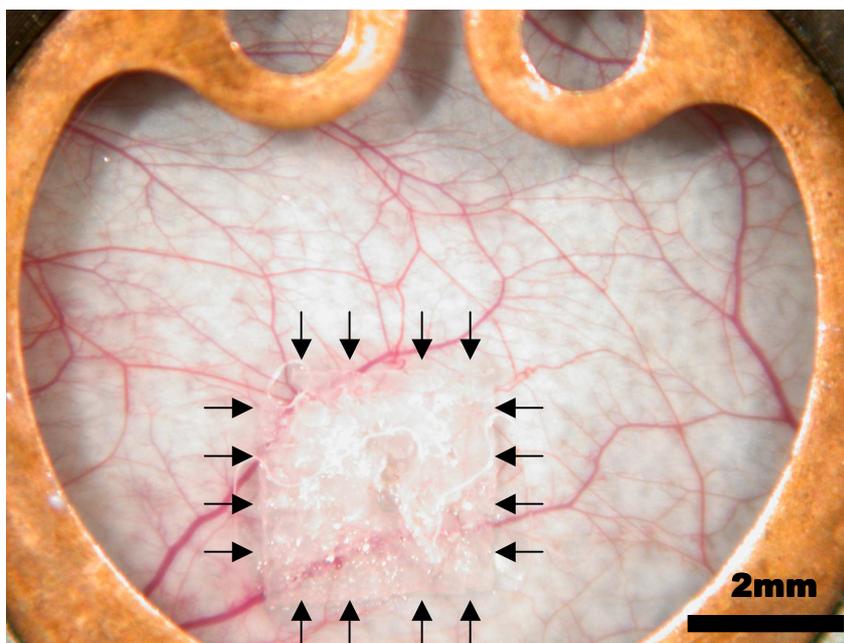


Abb. 6: Polyethylenimplantat (3 x 3 x 0,25 mm) in der Rückenhautkammer unmittelbar nach Implantation

3.1.3 Ausschlusskriterien

Die Versuchstiere tolerierten die Präparation der Rückenhautkammer in der Regel gut und zeigten keine Auffälligkeiten im Verhalten oder Mobilitätseinschränkungen durch die Titankammer.

Tiere, die auch nach einer postoperativen Erholungsphase von ein bis zwei Tagen untypische Verhaltensweisen, Gewichtsverlust und/oder verminderte Reaktion auf äußere Reize zeigten, wurden vom weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen. Gleiches galt für Tiere, die bei makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle der Rückenhautkammern Einblutungen sowie allgemeine Entzündungszeichen wie putride Sekretion oder ödematöse Schwellung zeigten (Sewell, 1966).

3.1.4 Makroskopische Dokumentation

An den jeweiligen Untersuchungstagen wurden die Rückenhautkammern vor ihrer intravitalmikroskopischen Untersuchung mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 995; Nikon Corp, Tokio, Japan) makroskopisch im Auflicht und unter Transillumination fotografiert (s. Abb.7).

Wie bereits bei der Biomaterialimplantation beschrieben, wurden die Tiere in einer Plexiglasröhre auf der zugehörigen Bühne fixiert. Die Übersichtsaufnahmen wurden so angefertigt, dass die präparierte Kammer in vollem Umfang mit dem umgebenden Sprenging zu sehen war. Sie dienten zur Kontrolle der Kammern auf Unversehrtheit vor Aufnahme eines Tieres in eine der Versuchsgruppen.

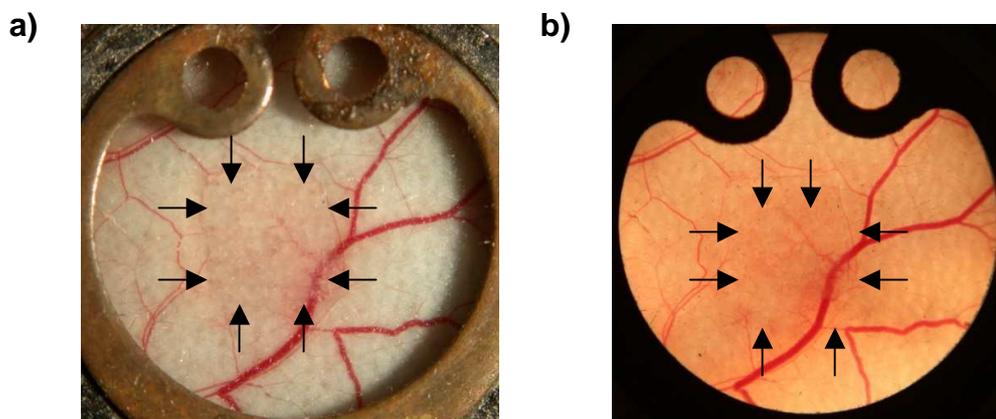


Abb. 7: Dokumentation und makroskopische Kontrolle der Rückenhautkammern mit Auflicht (a) sowie unter Transillumination (b)

3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung und quantitative Analyse der Angiogenese und Neovaskularisation des implantierten Polyethylens sowie der Leukozyten-Endothelzellinteraktion *in vivo* erfolgte durch Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, da mit dieser Untersuchungsform im Vergleich zu anderen Methoden die Möglichkeit der Beurteilung sämtlicher Segmente der Mikrozirkulation und der quantitativen Analyse verschiedener mikrohämodynamischer Parameter besteht (Endrich et al., 1980; Menger, Pelikan et al., 1992).

3.2.1 Verwendete Fluoreszenzmarker

Da sowohl mikrohämodynamische Parameter als auch die Leukozyten-Endothelzellinteraktion gemessen werden sollten, kamen zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarker zum Einsatz.

3.2.1.1 (FITC)-markiertes Dextran

Um die mikrohämodynamischen Parameter bei der Angiogenese bestimmen zu können, wurde fluoreszierendes Dextran als Plasmamarker verwendet. Es färbt das Plasma und führt so indirekt auch zu einer Darstellung der Gefäße (s. Abb. 8a). Auf diese Weise ermöglichen sie durch ihre homogene Verteilung nach intravenöser Applikation eine Visualisierung des funktionellen Gefäßsystems über einen ausreichend langen Zeitraum, so dass dieses Verfahren bereits in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe vor allem bei der Analyse intratumoraler Gefäße verwendet wurde (Buerkle et al., 2002; Strieth et al., 2004; Strieth et al., 2006). In dieser Arbeit kam hochmolekulares Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC; MW 500kD; Sigma, Deisenhofen) -markiertes Dextran (0,08-0,1 ml einer 5%- Lösung in 0,9% NaCl) zur quantitativen Analyse der Gefäßneubildung zum Einsatz (Filter Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen).

3.2.1.2 Rhodamin 6G

Um mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auch eine Aussage über die Leukozyten-Endothelzellinteraktion nach Einbringen der Polyethylen-Implantate treffen zu können, wurde Rhodamin 6G (0,08-0,1ml einer 0,1%-Lösung in 0,9% NaCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) intravenös verabreicht. Rhodamin 6G reichert sich in den Mitochondrien von Leukozyten an. Es konnte zeitgleich mit den markierten Dextranen appliziert werden. So ist es möglich, die Leukozyten unter Verwendung eines anderen Filters (Exzitation 510-560 nm,

Emission 590 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) in der selben Untersuchung zu quantifizieren (s. Abb. 8b).

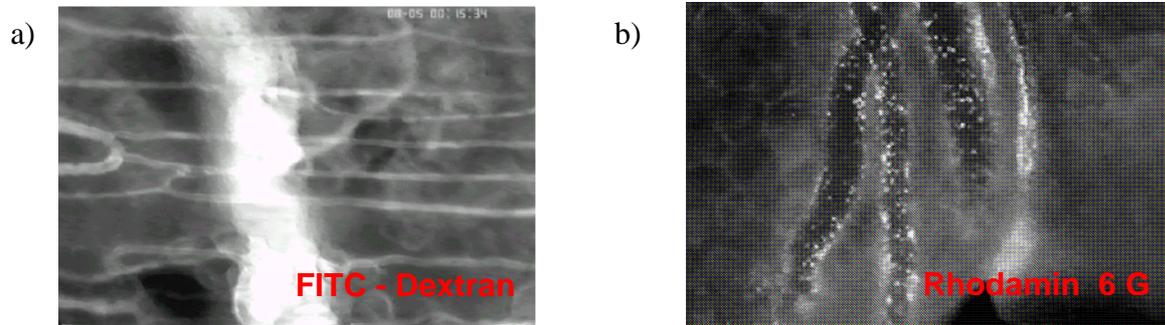


Abb. 8: Unterschiedliche Darstellung der Gefäße bei der Markierung mit FITC-Dextran (a) und Rhodamin 6 G (b) in der Fluoreszenzmikroskopie

3.2.2 Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz war mit folgenden Geräten ausgestattet:

- Fluoreszenzmikroskop (Axiotech vario; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Elektronisch steuerbarer Objektisch (x-y Richtung) mit integrierter fiberoptischer Durchlichtquelle (Fa. Märzhäuser, Wetzlar)
- Objektive unterschiedlicher Vergrößerungsstufen (Plan-Neofluar[®] x 4; x 10; x 20; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Reflektorschieber 3FL mit Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) und Filterset 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- SIT-Videokamera (C2400-08; Hamamatsu, Herrsching)
- Digitaler Videorekorder (Sony DVCAM DSV 45P; Sony, Köln)
- Videozeitgenerator (VTG 33; FOR-A-Company Ltd.,Tokyo, Japan)

Das Mikroskop verfügte über eine manuelle Feinfokussierung durch Mikro- und Makroantrieb. Über einen Schrittmotor kann der Objektisch mit einer Steuerkonsole und entsprechender Software (KS 400, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) sowohl in x- wie auch in y-Achse verschoben werden. Es konnte durch den Benutzer ein beliebiger Bezugspunkt im Koordinatensystem gewählt und abgespeichert werden. Von diesem Referenzpunkt aus ließ sich jede Koordinate in $1/100$ mm –Schritten per Micromanipulator anwählen bzw. über ein Ziffernfeld auf der Steuerkonsole direkt anfahren, womit eine wiederholte Untersuchung einzelner Areale in zeitlichen Abständen möglich ist. Die Filterleiste war so angebracht, dass eine Untersuchung sowohl mit verschiedenen Filtern als auch mit reinem Durchlicht möglich war.

Ein angeschlossener Videozeitgenerator erlaubte die Codierung der Bänder mit Datum und Uhrzeit für die spätere Dokumentation (s. Abb. 9).

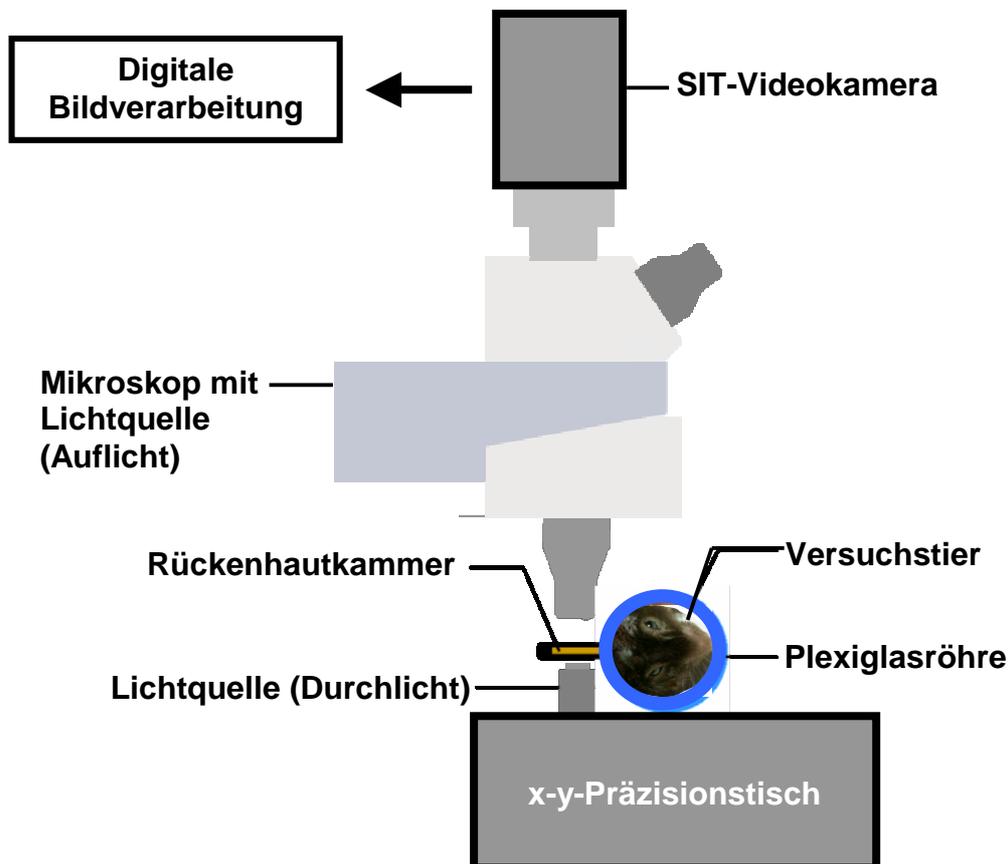


Abb. 9: Schema des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes: Nach Gabe der Fluoreszenzmarker konnten die mikrohämodynamischen Parameter und die Leukozyten-Endothelzellinteraktion mit Hilfe der Videoeinheit aufgezeichnet und später offline digital ausgewertet werden.

3.2.3 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Videobildanalyse

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Tiere zunächst, wie in 3.1.2 beschrieben, in Plexiglasröhren immobilisiert. Anders als beim Einbringen der Implantate wurden die Tiere im Anschluss leicht mit Halothan (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ, USA) anästhesiert. So konnte ihnen über einen Katheter (Einmalkanüle 0,4 mm x 20 mm, Sterican, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz), der durch Punktion einer der beiden Schwanzvenen gelegt wurde, jeweils 0,08-0,1 ml FITC- Dextran und Rhodamin 6G injiziert werden. Der Katheter wurde zwischen den Markerapplikationen mit 0,9% NaCl gespült. Der Plasmamarker flutet sehr rasch an, so dass nach Gabe der Floreszenzmarker mit der mikroskopischen Untersuchung begonnen werden konnte, sobald die Tiere wieder bei vollem Bewusstsein waren, um etwaige Einflüsse der Sedierung auf den Blutfluss auszuschließen. Die Plexiglasbühne, die wiederum zur Aufnahme und Fixierung der Plexiglasröhren diente, wurde auf dem fahrbaren Objektisch mit Schrauben fixiert.

Nach Begutachtung der Kammer und Auffinden des Implantates bei geringer Vergrößerung wurden die darauffolgenden Aufzeichnungen alle mit mikroskopischer Vergrößerung (20x) angefertigt.

Zunächst wurde jeweils eine obere Ecke des quadratischen Polyethylen-Implantats als Bezugspunkt im Koordinatensystem gewählt und die Steuerkonsole des Objektisches entsprechend normiert. Davon ausgehend wurden für die Aufzeichnung jeweils 6 Messareale (*Regions of interest = ROI*) angesteuert. Je ein ROI an den vier Implantaträndern und zwei Ausschnitte aus dem Implantatzentrum wurden beobachtet und deren Koordinaten auf einem Verlaufsprotokoll vermerkt, um die Regionen bei späteren Untersuchungen wieder auffinden zu können.

Pro ROI wurden zunächst 30 s-lange Bildsequenzen unter Verwendung geeigneter Fluoreszenzfilter für FITC-Dextran zur Beurteilung der mikrohämodynamischen Parameter aufgezeichnet. Direkt im Anschluss erfolgte nach Filterwechsel eine ebenfalls 30 s-lange Aufzeichnung im Emissionsbereich von Rhodamin 6G zur Analyse der Leukozyten-Endothelzellreaktion.

Insgesamt wurde darauf geachtet, die Untersuchungszeit der einzelnen Tiere möglichst kurz zu halten, um etwaige phototoxische Effekte im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie zu minimieren (Steinbauer et al., 2000).

Die Auswertung der Videoaufzeichnungen (Klyscz et al., 1997) erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe eines Bildanalyseystems (Cap Image, Zeintl, Heidelberg) an einem Personalcomputer mit Bildbearbeitungskarte (IP-8/AT; Matrox, Quebec, Kanada). Dieser

wurde über eine RS-232 Schnittstelle mit dem digitalen Videorekorder (Sony DVCAM DSV 45P; Sony, Köln) verbunden, der außerdem an einen Videomonitor (PVM 1442QM; Sony; Köln) angeschlossen war.

Das verwendete Programm ermöglichte sowohl die Bestimmung wichtiger Parameter der Mikrozirkulation (s. 4.3.1) als auch der Leukozyten-Endothelzellinteraktion (s. 4.3.2).

3.3 Messparameter

Zur Quantifizierung der Angiogenese und Analyse der mikrohämodynamischen Situation im Bereich des Polyethylenimplantats sowie der dort auftretenden Leukozyten-Endothelzellinteraktionen wurden folgende Parameter bestimmt:

- Funktionelle Gefäßdichte (fvd) $[\text{cm}^{-1}]$
- Gefäßdurchmesser (d) $[\mu\text{m}]$
- Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}) $[\text{mm/s}]$
- Leukozytenflux $[1/\text{mm/s}]$
- Leukozytenadhärenz_{Gefäß} $[1/\text{mm}^2]$

Des Weiteren wurde lichtmikroskopisch drei Tage nach Implantation der gesamte Implantatbereich und das umgebende Kammergewebe am Implantatrand unabhängig von messbaren mikrohämodynamischen Parametern auf sichtbare Anzeichen von Angiogenese untersucht. Als positives Zeichen für einsetzende Gefäßneubildung wurden Gefäßaussprossungen (sprouts) gewertet, die sich aus den Blutgefäßen (meist den kleinen venösen Kapillaren und postkapillären Venen des umgebenden Gewebes) bildeten und bei denen häufig noch kein Blutfluss nachweisbar war.

3.3.1 Mikrohämodynamische Parameter

Die Messwerte wurden mit Hilfe des Bildanalyseystems *Cap-Image* bei der offline-Auswertung des Videomaterials erhoben. Pro ROI wurden dafür die 30 s-langen Videosequenzen analysiert, die bei der Fluoreszenzmikroskopie im Emissionsbereich des Plasmamarkers FITC- Dextran aufgezeichnet wurden.

3.3.2 Gefäßdurchmesser

Es wurden bei 20-30 Gefäßen pro ROI die Durchmesser gemessen und für die spätere statistische Auswertung und graphische Darstellung der arithmetische Mittelwert der Einzelwerte berechnet (siehe Abb. 10).

3.3.3 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Dieser Messparameter wurde mit Hilfe der *Line-Shift-Diagramm-Methode* (Klyscz et al., 1997) ermittelt. Hierbei wird zunächst im Standbildmodus im zu untersuchenden Gefäß eine parallel zum Gefäßverlauf liegende Messlinie digital eingezeichnet. In einer 10 s-langen Videosequenz werden durch das Bildanalyseprogramm für jedes Halbbild Grauwerte entlang der Messlinie registriert und daraus ein Line-Shift-Diagramm erzeugt. Darin werden die unterschiedlichen Grauwerte als vertikale Linien nebeneinander dargestellt, wobei die Länge der x-Achse der zeitlichen Messperiode (10 s), die y-Achse der eingezeichneten Messlinie entspricht. Somit erzeugt ein entlang der Messlinie bewegter Erythrozyt, abhängig von seiner Geschwindigkeit, eine mehr oder weniger steile Linie. Die Neigung der Linie kommt durch die fortschreitende Bewegung von Halbbild zu Halbbild über die Zeit entsprechend seiner Flussrichtung zustande. Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit ($=ds/dt$) wird nun als Mittelwert aus den Steigungen der einzelnen Linien berechnet.

3.3.4 Funktionelle Gefäßdichte

Die Funktionelle Gefäßdichte ist definiert als die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße bezogen auf die Fläche des Messareals. Sie ist ein wichtiger Parameter bei der Quantifizierung der Angiogenese (Dellian et al., 1996; Nolte et al., 1995).

Zur Messung der funktionellen Gefäßdichte wurden alle im Bild mit Plasmamarker perfundierten Gefäße digital nachgezeichnet. Keine Berücksichtigung fanden Gefäße, die sich kontrastlos darstellten bzw. innerhalb der 30 Sekunden keinen sichtbaren Blutfluss zeigten (Abb. 10).

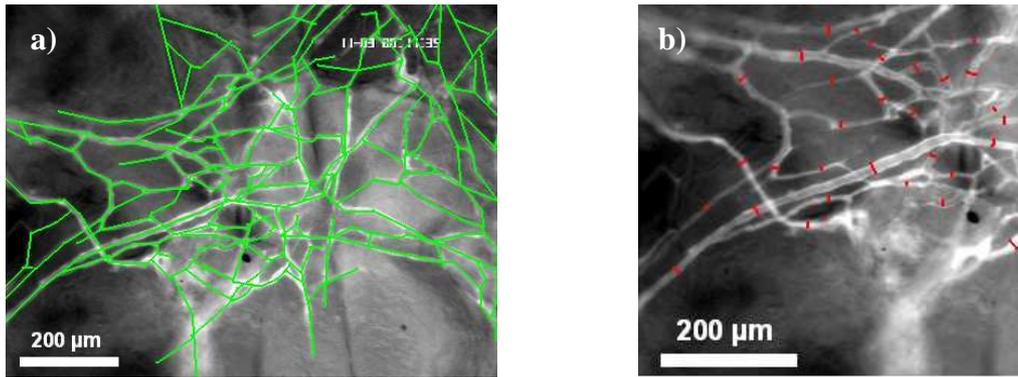


Abb. 10: Messung der funktionellen Gefäßdichte (a) und der Gefäßdurchmesser (b) mit dem Bildanalyseprogramm *Cap-Image*

3.4 Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Auch diese Messwerte wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms *Cap-Image* bei der *offline*-Auswertung des Videomaterials bestimmt. Pro ROI wurde dafür eine 30 s lange Videosequenz analysiert, die bei der Fluoreszenzmikroskopie im Emissionsbereich des Plasmamarkers Rhodamin 6G aufgezeichnet wurde.

3.4.1 Leukozytenflux

Der Leukozytenflux war als Anzahl der Leukozyten definiert, die einen ausgewählten Gefäßabschnitt, markiert durch eine Linie senkrecht zur Gefäßachse, in einem bestimmten Zeitintervall (30 s) passieren. Die Angabe erfolgte in Anzahl pro Millimeter pro Sekunde [mm^{-1}/s].

3.4.2 Leukozytenadhärenz_{Gefäß}

Alle Leukozyten, die über einen Zeitraum von 30 s fest mit dem Endothel interagierten und sich im gesamten Beobachtungszeitraum nicht bewegten, wurden als adhärenz bezeichnet und gezählt. Ihre Anzahl wurde auf Quadratmillimeter Gefäßoberfläche bezogen [$1/\text{mm}^2$].

3.5 Dynamische Desintegrationskraft

Die mechanische Integration des porösen Polyethylens in das umgebende Gewebbett wurde über die dynamische Desintegrationskraft an Tag 14 nach Implantation gemessen (siehe auch Versuchsprotokolle 4.2). Hierbei wurde die Zeit gemessen, die nötig ist, um ein Implantat aus dem Gewebelager zu luxieren ($\text{cN/mm}^2/\text{sec}$) (Laschke, Haufel et al., 2005).

3.5.1 Aufbau der Messstation

Um eine dynamische Kraftentwicklung in definierter Richtung auf das zu testende Implantat ausüben zu können, wurde die Rückenhautkammer in einer Plexiglasbühne fixiert, welche auf einem verstellbaren Tisch mit Schrauben fixiert wurde (Abb. 11). Der Modelltisch konnte über einen Drehgriff stufenlos in seiner Höhe reguliert werden. An einem Stativ wurde an einem Ausleger eine Federwaage (Messbereich 0-3 Newton; Kern & Sohn GmbH, Balingen) befestigt, die genau senkrecht über dem Beobachtungsfenster der Titankammer positioniert wurde. So konnte das an einem Faden fixierte Implantat an die Federwaage angehängt und durch gleichmäßiges Absenken des Modelltisches einer dynamischen Zugkraft ausgesetzt werden. Es wurde die Zeit von Beginn der Kraftausübung bis zum vollständigen Lösen des Implantats aus der Kammerpräparation gemessen.

3.5.2 Messung der dynamischen Desintegrationskraft

Für die Messung der Desintegrationskraft wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketaminhydrochlorid Ketavet[®] (Ketaminhydrochlorid, Pharmacia GmbH, Erlangen) und Rompun[®] (Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen) geopfert. Die Rückenhautkammer wurde wie bei der Fluoreszenzmikroskopie auf der Plexiglasbühne fixiert und das Deckglas vorsichtig abgenommen. Unter einem OP-Mikroskop mit 25-facher bzw 40-facher Vergrößerung (Wild M650; Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) wurde die jeweils rechte obere Ecke des quadratischen Polyethylenkörpers mit einer Einmalkanüle (0,40 mm x 20 mm, Sterican, B.Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) vorgestanzt und im Anschluss daran möglichst atraumatisch mit einem Polyamidfaden (Ethilon[®] 9-0, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA) fixiert. Im Anschluss daran wurde die Plexiglasbühne auf dem Modelltisch der Messstation plaziert und der Faden mit einer Schlaufe an der Federmesswaage eingehängt. Dann wurde der Ausleger des Stativs derart ausgerichtet, dass der Faden exakt senkrecht vom Implantat zur darüber plazierten Federwaage gespannt war, ohne jedoch bereits eine Kraft auf das Implantat auszuüben.

Durch Absenken des Tisches wurde nun eine dynamische Zugkraft beginnend bei 0,1 N auf das nahtfixierte Implantat ausgeübt. Die Zeitspanne bis zum vollständigen Herauslösen des Polyethylenkörpers aus dem Implantatbett ist direkt proportional zur Desintegrationskraft (cN/mm^2 , (Laschke, Haufel et al., 2005; Menger, Hammersen et al., 1992)

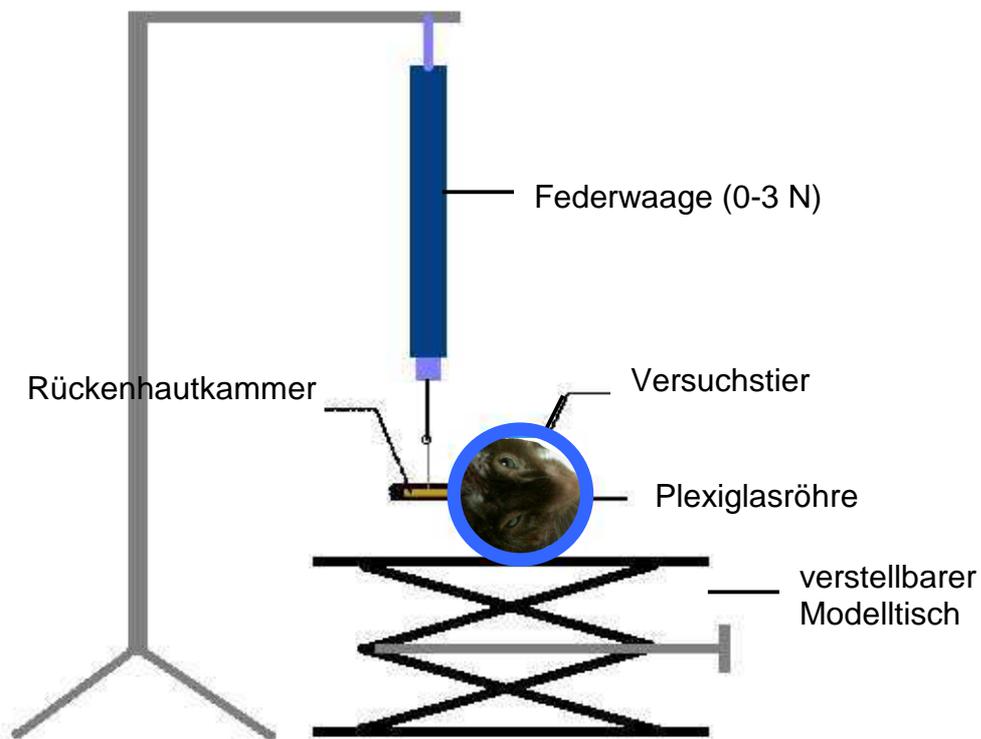


Abb. 11: Schematische Versuchsanordnung zur Bestimmung der dynamischen Desintegrationskraft; Über eine aufgehängte Federwaage und einen verstellbaren Modelltisch kann eine dynamische Zugkraft auf das fixierte Implantat ausgeübt werden.

4. Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll

4.1 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen zu je 6 Tieren aufgeteilt. Jedem Tier wurde 48 h nach Kammerpräparation ein 3 x 3 x 0,25 mm großes quadratisches Implantat aus Polyethylen in die Kammerpräparation eingesetzt und im Anschluss über 14 Tage beobachtet.

Gruppe I erhielt als Kontrollgruppe ein poröses Polyethylenimplantat ohne weitere Vorbehandlung (siehe Abb.12), den Tieren aus Gruppe II wurde ein Polyethylenimplantat eingesetzt, das vor Einbringen in die Rückenhautkammer mit Extrazellulärmatrixkomponenten (ECM; BD Matrigel™ GFR, s. 2.2.1) beschichtet wurde. Die Implantate der Gruppe III wurden mit Extrazellulärmatrixkomponenten, die mit VEGF angereichert waren, beschichtet.

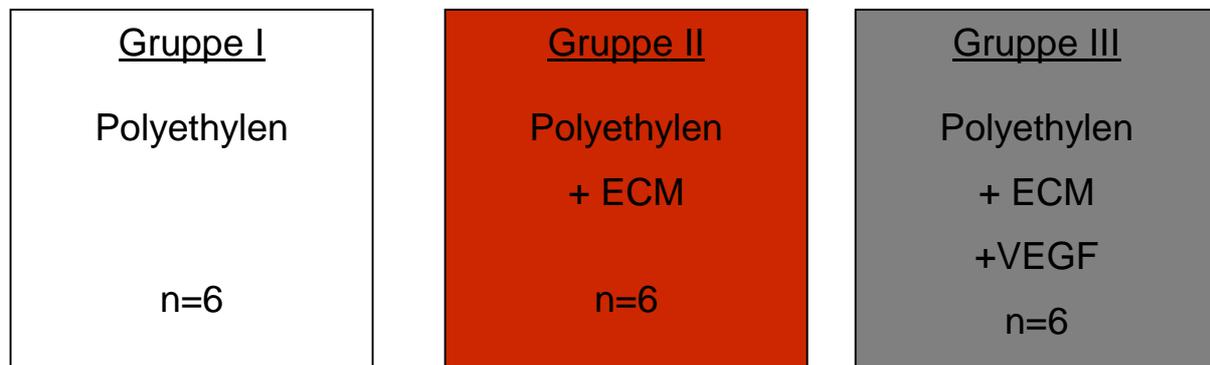


Abb. 12: Aufteilung der Versuchstiere nach erfolgter Kammerpräparation in 3 Gruppen mit je 6 Tieren

4.2 Versuchsprotokoll

Der gesamte Untersuchungszeitraum von der Kammerpräparation bis zur Tötung der Tiere und Messung der Desintegrationskraft betrug jeweils 16 Tage. Es wurde je 6 Mäusen, die das geforderte Mindestgewicht von 24-25g aufwiesen, am OP-Tag, wie bereits beschrieben, eine Titankammer eingesetzt. Die Tiere tolerierten den Eingriff und die Rückenhautkammer im Verlauf gut und zeigten nach 48h ein normales Fress-, Schlaf- und Sozialverhalten. Am zweiten Tag nach Kammerpräparation wurden die Polyethylenimplantate in die Kammern eingebracht.

3, 7, 10 und 14 Tage nach Implantation erfolgten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 13). Zusätzlich wurde jede Kammer makroskopisch dokumentiert (s. 3.1.4) und das Körpergewicht der Versuchstiere ermittelt. Im Anschluss an die IVM-Untersuchung am Tag 14 wurden die Tiere durch eine Überdosis Ketaminhydrochlorid Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, Pharmacia GmbH, Erlangen) und Rompun® (Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen) getötet und abschließend die dynamische Desintegrationskraft gemessen.

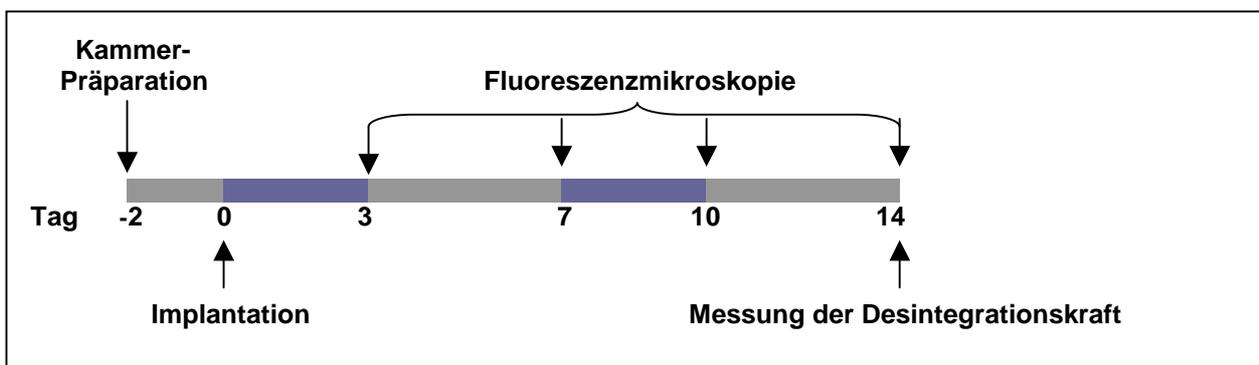


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf der Kammerpräparation, der darauffolgenden Implantation der PPE-Implantate und der Intravitalmikroskopie an festgelegten Tagen

5. Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Zur graphischen Darstellung wurde für jedes Versuchstier der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen der einzelnen Messungen errechnet. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM).

Der statistische Gruppenvergleich erfolgte anhand nichtparametrischer Rangtests mit Hilfe einer Computersoftware (Sigma Stat; Jandl Corp., San Rafael, CA, USA). Für die Testung innerhalb einer Gruppe wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon angewandt. Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde eine Varianzanalyse nach *Kruskal-Wallis* mit *Post-hoc*-Analyse nach *Student-Newmann-Keuls* durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet.

III ERGEBNISSE

1. Angiogenese und Analyse der mikrohämodynamischen Messwerte

In allen drei Gruppen wurde die Angiogenese mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie beurteilt und anhand von drei Messparametern (Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und funktionelle Gefäßdichte) analysiert (Abb. 14). Dabei wurden an einem Messtag pro Tier sechs ROIs im Randbereich und im Zentrum des Implantatkörpers ausgewertet. Zudem wurde das gesamte Implantat und das angrenzende Kammergewebe unter 10- bzw. 20-facher Vergrößerung auf sichtbare Zeichen von Angiogenese, z.B. Gefäßeinsprossungen ins Implantat, unabhängig von messbaren hämodynamischen Parametern untersucht. Dabei konnte in allen Gruppen im Verlauf der vier Beobachtungstage eine initiale Gefäßneubildung, ausgehend vom umgebenden Gewebe im Randbereich der Implantatkörper, festgestellt werden. In keiner der drei Gruppen wurden am dritten Tag nach Implantation bereits funktionelle Gefäße im Implantat selbst gefunden. Lediglich erste Gefäßausprossungen, ausgehend von den kleinen venösen Kapillaren und postkapillären Venen des Implantatbetts waren in der Randzone um die Polyethylen-Körper zu erkennen.

Sieben Tage nach Implantation waren in Gruppe III (ECM+VEGF) noch immer wenige durchblutete Gefäße im PPE-Implantat feststellbar. Lediglich in den Randbereichen der Implantate konnte eine beginnende Angiogenese anhand von einwachsenden Gefäßstümpfen beobachtet werden, die allerdings noch keinen funktionellen Blutfluss aufwiesen. In den Gruppen I (Kontrolle) und II (ECM) hingegen waren bereits erste Gefäßarkaden in der Implantatperipherie mit sichtbarer Blutzirkulation erkennbar. Am zehnten Tag konnte in allen drei Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte im Vergleich zum jeweils vorangegangenen Messzeitpunkt beobachtet werden, jedoch mit noch unterschiedlich ausgeprägter funktioneller Durchblutung der neu entstandenen Gefäßformationen. In Gruppe I war der Randbereich der Polyethylenquadrate bereits gleichmäßig mit durchbluteten Gefäßen durchsetzt, in Gruppe II erstreckten sich die neuen Blutgefäße bei der Hälfte der Versuchstiere sogar schon bis ins Zentrum des Implantatkörpers, wohingegen in der dritten Gruppe (ECM+VEGF) nur bei einem Teil der Versuchstiere eine gleichmäßige funktionelle Gefäßversorgung des Implantatrands festgestellt werden konnte. Bei zwei Tieren war diese nur in Teilbereichen feststellbar, im restlichen Randbereich überwogen Gefäße, in denen noch kein Blutfluss nachweisbar war. Am Tag 14 waren die Implantate aller drei Gruppen gleichmäßig mit Blutgefäßen durchzogen und es konnten in der Übersicht keine Unterschiede in der Vaskularisierung mehr festgestellt werden.

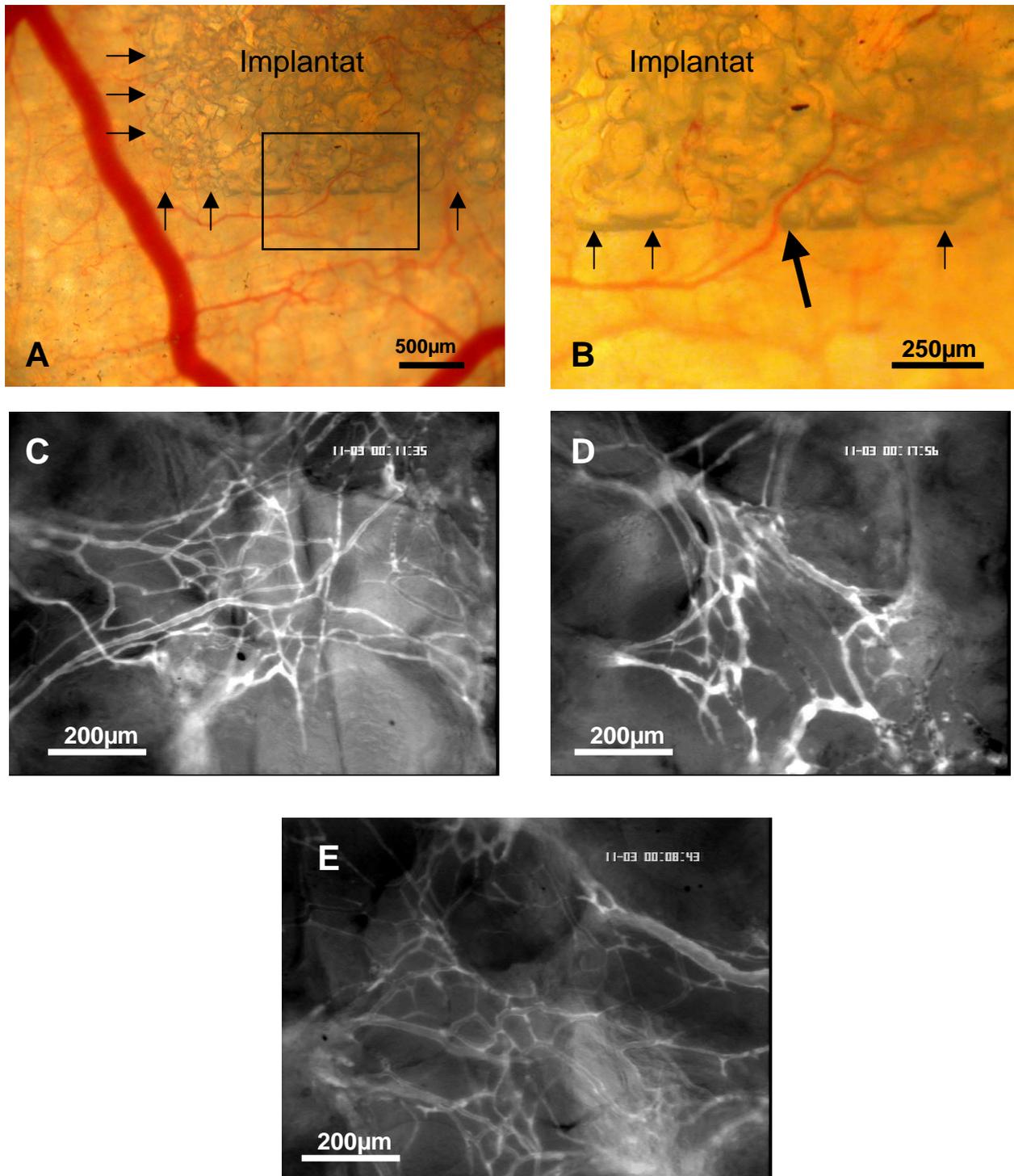


Abb. 14: Mikroskopische In vivo-Analyse der Angiogeneseaktivität

A: Einwachsen von Blutgefäßen in ein Polyethylenimplantat der Kontrollgruppe, Tag 10

B: Vergrößerte Darstellung des in A gekennzeichneten Bereichs zur detaillierten Ansicht

C, D und E: Die In vivo-Fluoreszenzmikroskopie zeigt deutlich die vaskularisierten Areale der Implantate an Tag 14 des Beobachtungszeitraums (**C:** ECM, **D:** ECM + VEGF, **E:** Kontrolle)

1.1 Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser der funktionellen Blutgefäße in den drei Gruppen wiesen am Tag 7 keine signifikanten Unterschiede auf. In der Gruppe I wurde ein Mittelwert von $6,1 \mu\text{m} \pm 0,66 \mu\text{m}$, in Gruppe II von $5,03 \mu\text{m} \pm 1,45 \mu\text{m}$ und in Gruppe III von $3,01 \mu\text{m} \pm 1,88 \mu\text{m}$ gemessen.

In der Kontrollgruppe konnte auch an den beiden folgenden Beobachtungstagen 10 und 14 keine signifikante Veränderung der Gefäßdurchmesser mehr festgestellt werden, ebenso in den beiden Versuchsgruppen (ECM; ECM + VEGF). Am Tag 14 waren die Mittelwerte in allen Gruppen vergleichbar, sowohl im Vergleich unter den Gruppen als auch im Vergleich zum vorangegangenen Messtag (Abb. 15).

(Kontr.: $6,77 \mu\text{m} \pm 0,38 \mu\text{m}$; ECM: $7,38 \mu\text{m} \pm 0,47 \mu\text{m}$; ECM + VEGF: $7,09 \mu\text{m} \pm 0,37 \mu\text{m}$)

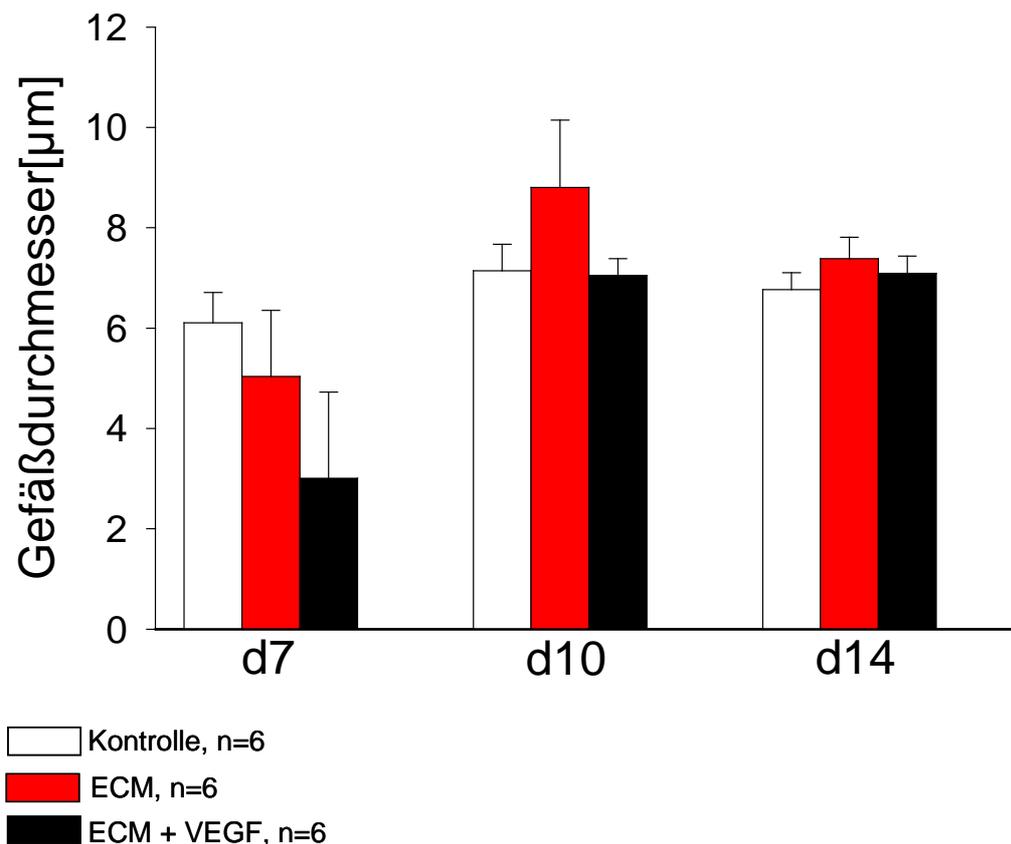


Abb. 15: Durchmesser der funktionellen Blutgefäße im Beobachtungszeitraum: Im gesamten Messzeitraum gab es keine signifikanten Messwertänderungen, sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Gruppen.

1.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Bei der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wurden am Tag 7 in allen drei Gruppen ähnliche Ausgangswerte gemessen (Kontr.: $0,040 \text{ mm/s} \pm 0,010 \text{ mm/s}$; ECM: $0,048 \text{ mm/s} \pm 0,012 \text{ mm/s}$; ECM + VEGF: $0,021 \text{ mm/s} \pm 0,015 \text{ mm/s}$). Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit zeigte sich am Messtag 10 in jeder der Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zu Tag 7, wobei in der Gruppe II der höchste Mittelwert erreicht wurde, der jedoch nicht signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe III war. Am Tag 14 ergaben sich in allen Gruppen vergleichbar hohe Erythrozytenfließgeschwindigkeiten, die auch sonst in differenzierten Kapillaren zu messen sind (Abb. 16).

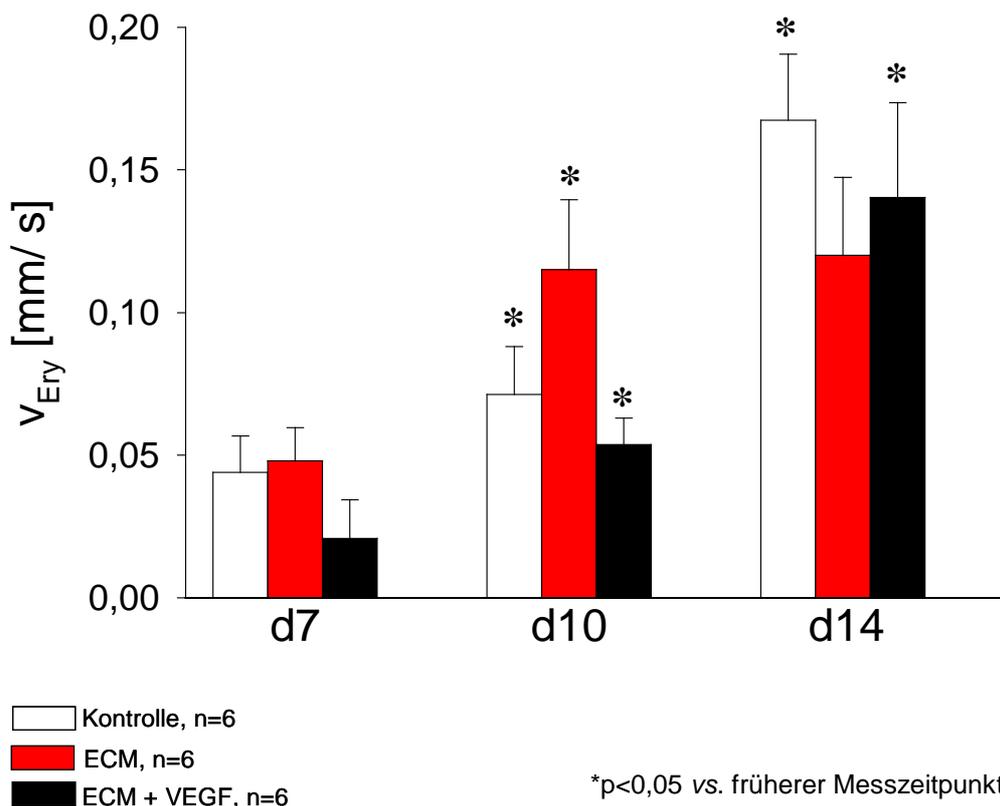


Abb. 16: Erythrozytenfließgeschwindigkeit: Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Messwerte in allen drei Gruppen am Tag 10. Am Ende des Beobachtungszeitraums ergaben sich vergleichbar hohe Erythrozytenfließgeschwindigkeiten in allen Gruppen.

1.3 Funktionelle Gefäßdichte

Wie bei den Messungen der Erythrozytenfließgeschwindigkeiten konnten am Tag 7 in allen drei Gruppen vergleichbare Werte bei der Messung der funktionellen Gefäßdichte festgestellt werden. Auch hier kam es am Tag 10 in jeder Gruppe zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zum früheren Messzeitpunkt. In der Gruppe II konnten wiederum leicht höhere Messwerte verzeichnet werden als in den anderen Gruppen (ECM: $177,84 \text{ 1/cm} \pm 14,99 \text{ 1/cm}$; Kontrolle: $109,9 \text{ 1/cm} \pm 13,61 \text{ 1/cm}$; ECM + VEGF: $103,96 \text{ 1/cm} \pm 29,66 \text{ 1/cm}$), wobei dieser Unterschied nicht signifikant war.

Am letzten Messtag fanden sich in allen Gruppen dann vergleichbar hohe funktionelle Gefäßdichten (Abb. 17).

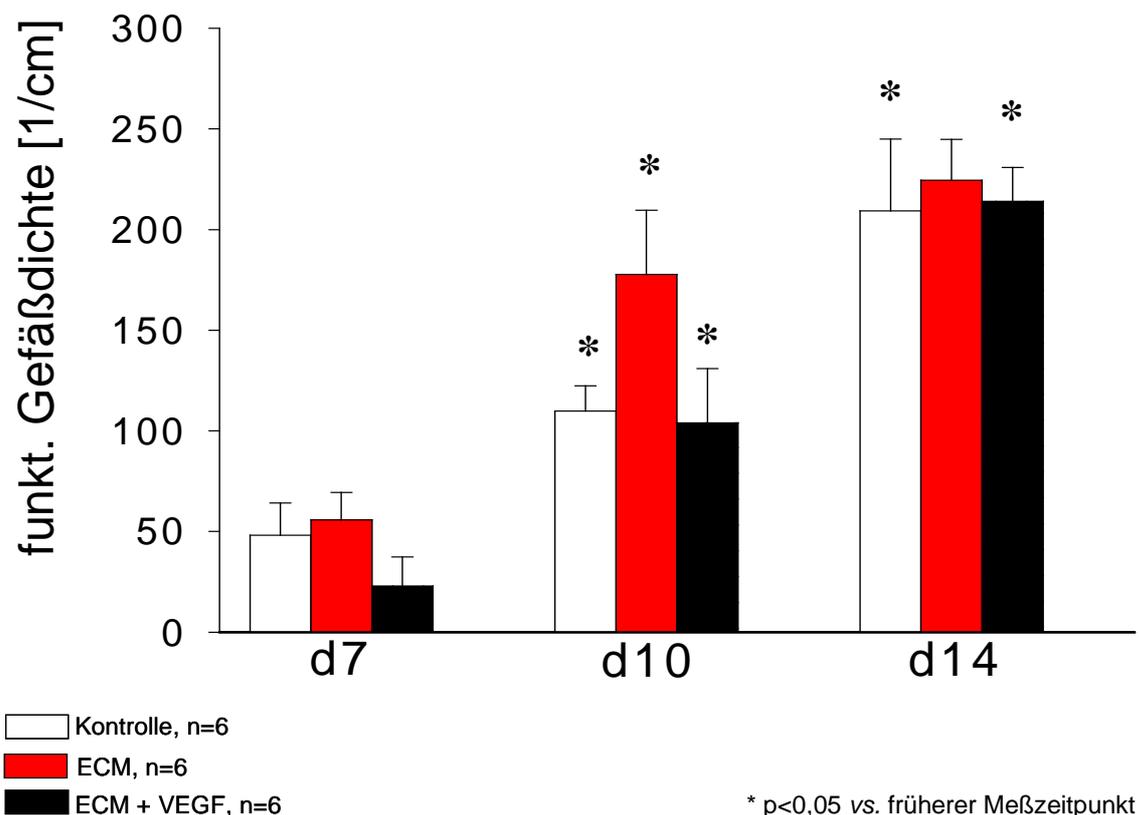


Abb. 17: Funktionelle Gefäßdichte: Im Versuchsverlauf zeigte sich jeweils eine signifikante Steigerung der Gefäßdichte in allen Gruppen am Tag 10 im Vergleich zu Tag 7. Am Ende des Beobachtungszeitraums fanden sich in allen Gruppen vergleichbar hohe funktionelle Gefäßdichten.

2. Leukozyten-Endothelzellinteraktion

2.1 Leukozytenflux

Die Messung der frei zirkulierenden Leukozyten zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

2.2 Leukozytenadhärenz

Bei der Messung der Leukozytenadhärenz fiel bei der ersten Messung an Tag 7 ein signifikant reduzierter Wert in der Gruppe III im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen auf. Besonders hohe Leukozytenadhärenzwerte zeigten sich bei den unbeschichteten Kontrollimplantaten. Im weiteren Verlauf sanken aber auch in den beiden anderen Gruppen die Anzahl der adhärenenten Leukozyten. Am letzten Messtag (d14) wurden in allen drei Gruppen vergleichbar niedrige Werte gemessen (Abb. 18).

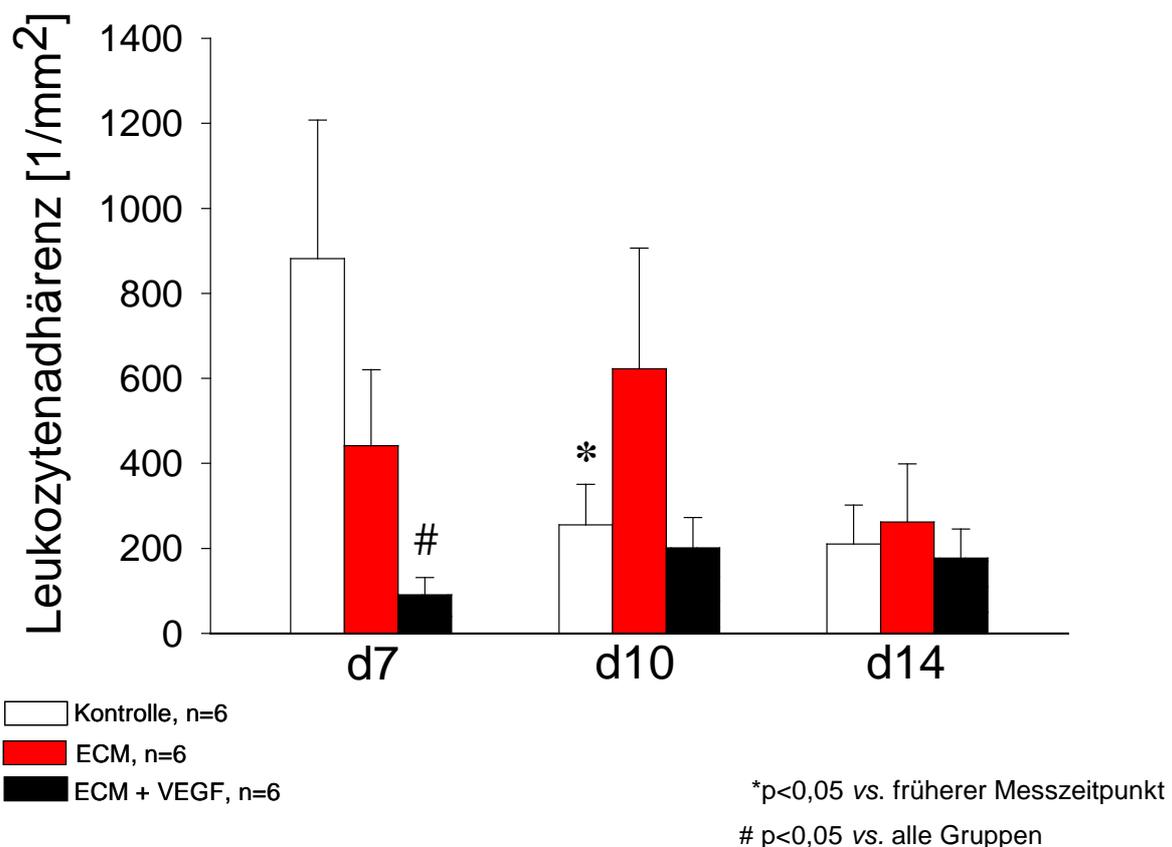


Abb. 18: Leukozytenadhärenz [$1/\text{mm}^2$] Hoch signifikante Reduktion an Tag 7 innerhalb der Gruppe III im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes fanden sich dann aber in allen Gruppen niedrige Leukozytenadhärenzwerte.

3. Dynamische Desintegrationskraft

Bei der Messung der mechanischen Integration der Polyethylenimplantate in das umgebende Kammergewebe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen festgestellt werden. Tendenziell zeichneten sich jedoch höhere Messwerte in der Gruppe mit den ECM-beschichteten Implantaten ab. Aufgrund starker Streuung der gemessenen Werte innerhalb der Gruppe war dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 19).

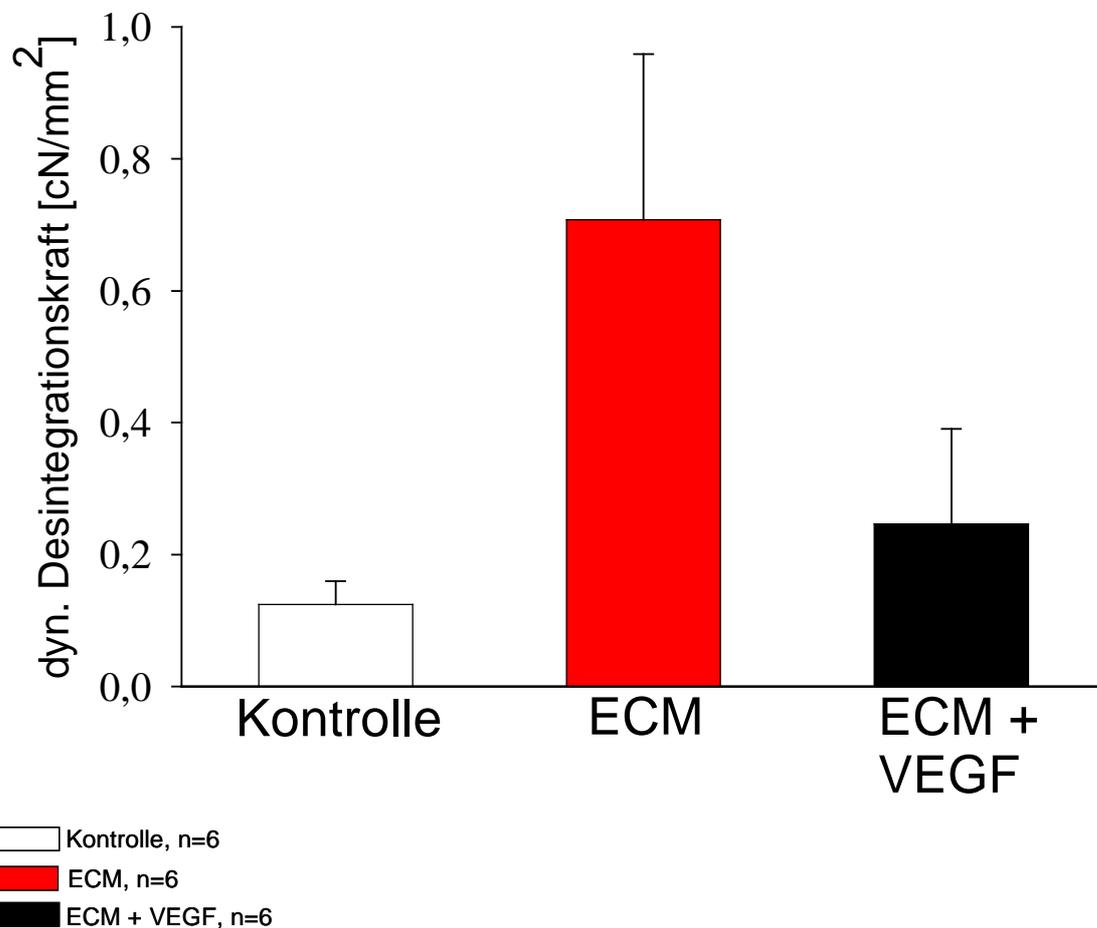


Abb. 19: Messung der mechanischen Integration der PPE –Implantate an Tag 14. Keine signifikanten Gruppenunterschiede, jedoch tendenziell höhere Messwerte in der Gruppe II (ECM)

IV DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

1.1 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten einer besseren Integration eines bereits klinisch eingeführten Biomaterials aus porösem Polyethylen (Berghaus, 1985; Lee et al., 2005) durch *Tissue engineering in vivo* zu prüfen. Die Modifikation des Biomaterials bestand in einer Beschichtung mit Extrazellulärmatrix und VEGF. Neben der vaskulären sollte auch die funktionelle mechanische Integration des verwendeten Implantatmaterials in das umliegende Wirtsgewebe analysiert werden (Laschke, Haufel et al., 2005). Dies erforderte ein Modell, das eine Untersuchung der porösen Polyethylenimplantate über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen erlaubte. Akutmodelle, wie sie unter anderem für den *Musculus cremaster* (Baez, 1973; Vollmar, Schmits et al., 2001) oder für den Dünndarm (Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999) beschrieben wurden, sind zum einen wegen der auf wenige Stunden begrenzten Untersuchungszeit ungeeignet. Des Weiteren kann auch das vorausgehende akute Trauma durch Präparation *per se* einen Einfluss auf die mikrohämodynamischen Parameter nehmen und zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen (Colantuoni et al., 1984; Franke & Endrich, 1983; Franke et al., 1982).

Ein weiteres gängiges Modell zur Untersuchung der Angiogenese ist der „*Chorionallantoic membrane assay*“ (CAM assay (Ribatti et al., 1996)). Diese Methode verwendet als Wirtsgewebe eine Membran aus embryonalem Harn- und Dottersack zwischen dem 5. und 15. Tag in der Entwicklung des Hühnerembryos. Dieses Gewebe verfügt über ein sehr dichtes Gefäßnetzwerk (Ribatti et al., 2001; Ribatti et al., 1996; Romanoff, 1952). Dieses Modell ist auf einen Untersuchungszeitraum von zehn Tagen limitiert. Die Beobachtung von Gefäßneubildungen mit einem Durchmesser unter 10 μm gestaltet sich als schwierig. Der wesentliche Nachteil ist allerdings die Inkompetenz des Immunsystems in diesem frühen Entwicklungsstadium. Somit sind Rückschlüsse auf die Biokompatibilität des eingebrachten Implantatwerkstoffs nur sehr eingeschränkt möglich (Laschke et al., 2006).

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer stellt ein seit langem eingeführtes und erprobtes *In vivo*-Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation und Angiogenese dar (Asaishi et al., 1981). Bereits 1924 von Sandison am Kaninchenohr beschrieben (Sandison, 1924), wurde die Kammerpräparation in den darauffolgenden Jahrzehnten auch bei Mäusen (Algire, 1943), Hamstern (Endrich et al., 1980; Warren et al., 1978) und Ratten (Papenfuss et

al., 1979) etabliert. Der große Vorteil dieses Modells im Vergleich zur CAM - Untersuchung liegt unter anderem in der Möglichkeit eines ausreichend langen Beobachtungszeitraums von bis zu vier Wochen (Menger & Lehr, 1993). Zudem wurden in zahlreichen Studien die Transplantation bzw. Implantation verschiedener syngener oder allogener Gewebe, beispielsweise Tumorzellen (Borgstrom et al., 1995; Eichhorn et al., 2007; Endrich et al., 1982; Leunig et al., 1992), Langerhansinseln (Menger, Jager et al., 1990; Vajkoczy et al., 1995), Ovarialfollikeln (Vollmar, Laschke et al., 2001) und Nebenschilddrüsengewebe (Strieth et al., 2005) sowohl bei immunkompetenten als auch –inkompetenten Versuchstieren (Cardon et al., 1970; Lehr et al., 1993) beschrieben.

Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das Modell der transparenten Rückenhautkammer hervorragend zur Bearbeitung der formulierten Fragestellungen. Die Kammerarchitektur lässt eine Implantation von Implantatkörpern bis zu einer Größe von ca. 5 mm x 5 mm x 1 mm in die Rückenhautkammer zu (Rücker et al., 2008). Angiogenese, mikrozirkulatorische Parameter und Leukozythen-Endothelzellinteraktionen können vom Tag der Implantation des zu untersuchenden alloplastischen Materials an über einen definierten Zeitraum von mindestens 14 Tagen *in vivo* am nicht narkotisierten Versuchstier untersucht werden. Mögliche Effekte einer Implantatbeschichtung mit Extrazellulärmatrixkomponenten oder Wachstumsfaktoren können so gut beobachtet werden (Laschke et al., 2006).

Dabei ist sichergestellt, dass die Kammern selbst weitgehend physiologische Beobachtungen zulassen. Mehrere Studien belegen, dass das Titan der verwendeten Kammern lediglich in den ersten 120 min nach Einsetzen zu einer vorübergehenden leichten Entzündungsreaktion führt, ohne eine signifikante Veränderung der Gefäßpermeabilität, eine Extravasation von Leukozyten oder eine Dilatation der Gefäßdurchmesser zur Folge zu haben (Kraft et al., 2001; Kraft et al., 2000; Lehr et al., 1993; Menger & Lehr, 1993; Rücker et al., 2006).

Um einer Verfälschung der Untersuchungen durch entzündliche oder traumatische Veränderungen des Operationsfeldes vorzubeugen, wurde die Implantation des zu untersuchenden Gewebes nach einer 48-stündigen Erholungsphase der Tiere von der Kammerpräparation durchgeführt und die von Sewell aufgestellten Anforderungen an eine intakte Mikrozirkulation als Einschlusskriterien für die Versuche berücksichtigt (Sewell, 1966). Die Erfolgsrate bei der Kammerpräparation war hiernach bei deutlich über 80%.

1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation und der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Entwicklung hochauflösender optischer Systeme und digitaler Technologien machen die Intravitalmikroskopie zu einem unverzichtbaren Instrument der modernen Mikrozirkulationsforschung (Vajkoczy et al., 2000).

Ihre Vorteile liegen in ihrem nicht-invasivem Ansatz, der hohen optischen Abbildungsqualität und der Möglichkeit der kontinuierlichen Beobachtung der Gefäßstrukturen. Im Gegensatz dazu wird bei einer rein histologischen Analyse das Gewebe lediglich zu einem einzelnen Zeitpunkt beurteilt, was Aussagen zu dynamischen Abläufen erschwert. Zudem können bei der Konservierung, dem Schneiden oder Färben der Gewebe Veränderungen an den Gefäßen auftreten, die zur Beeinträchtigung der Ergebnisse führen können (Choy et al., 2005; Dobrin, 1996).

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht neben einer morphologischen Untersuchung der Gefäßarchitektur, wie z.B. den durchschnittlichen Gefäßdurchmessern, auch die Erfassung mikrohämodynamischer Parameter. Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und funktionelle Gefäßdichte können somit im Versuchsverlauf an mehreren Messzeitpunkten quantifiziert werden (Tangelder et al., 1982). Ebenso ist die selektive Visualisierung korpuskulärer Blutbestandteile und die Analyse von Zell-Zell- bzw. Zell-Endothelzellinteraktionen *in vivo* durch Fluoreszenzmarkierung möglich (Katayama et al., 2000; Menger & Lehr, 1993; Vajkoczy et al., 2000).

Die Verwendung solcher Fluoreszenzfarbstoffe bei der Intravitalmikroskopie unterliegt jedoch auch einigen Limitationen. Gerade bei wiederholten Untersuchungen ausgewählter Gefäßabschnitte kann eine Akkumulation von Fluoreszenzmarkern, eine zu hohe Lichtintensität oder eine zu lange Belichtungszeit phototoxische Reaktionen hervorrufen, die eine Störung der vaskulären Integrität und der Funktion der Blutzellen bewirken können (Herrmann, 1983; Povlishock et al., 1983; Reed & Miller, 1988). Hiernach sollte die zugeführte Lichtenergie pro Untersuchungsareal so gering wie möglich gehalten werden, indem beispielsweise Bildverstärker und Kameras mit hoher Lichtintensität verwendet werden und die Beobachtungsdauer möglichst reduziert wird (Saetzler et al., 1997). Studien zur Abhängigkeit phototoxischer Effekte von der Art des Fluoreszenzfarbstoffes und der Lichtintensität konnten zeigen, dass bei Untersuchungen der Mikrozirkulation unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte nicht mit der Induktion einer phototoxischen Reaktion zu rechnen ist (Harris et al., 2002; Steinbauer et al., 2000).

Um das Ausmaß eventuell auftretender phototoxischer Reaktionen zu minimieren, fanden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen für die vorliegende Arbeit an einem Mikrozirkulationsarbeitsplatz statt, der unter anderem nach den oben genannten Kriterien konzipiert wurde. So kann durch Verwendung verschiedener optischer Filter eine Illumination ausschließlich im jeweils benötigten Lichtspektrum durchgeführt werden. Weiterhin ermöglicht ein computergesteuerter Objektisch das rasche Aufsuchen der Untersuchungsareale, wodurch die Belichtungsdauer und somit die applizierte Lichtenergie verringert werden kann. Ebenfalls zu einer verkürzten Belichtungsdauer trägt die Verbindung der Kamera mit einer Videodokumentationseinheit bei. Eine unmittelbare Auswertung während des Versuchs wird dadurch unnötig, da die angefertigten Aufnahmen zu einem späteren Zeitpunkt eingehend analysiert werden können.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1 *In vivo*-Untersuchung der mikrohäodynamischen Parameter

Da die Zellernährung in einem dreidimensionalen Implantatkörper auf eine Diffusionsstrecke von 150-200 μm begrenzt ist (Colton, 1995; Folkman & Hochberg, 1973), muss die Gefäßneubildung als wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Integration des Implantats in das Wirtsgewebe angesehen werden. Vor allem der Ablauf der Angiogenese scheint eine entscheidende Rolle bei der Einheilung des Implantats zu spielen (Laschke et al., 2006).

Bereits Laschke et al. konnten 2006 eine beschleunigte Vaskularisierung von PLGA-Implantaten (*poly-D,L-lactic-co-glycolic acid*) erreichen, indem diese mit extrazellulären Matrixkomponenten (BD MatrigelTM Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences, Heidelberg) beschichtet wurden, ohne dabei einen negativen Einfluss auf die Biokompatibilität zu verzeichnen (Laschke et al., 2006). MatrigelTM ist in unterschiedlichen Zusammensetzungen erhältlich, die sich hinsichtlich ihrer Wachstumsfaktorkonzentrationen unterscheiden. In der vorliegenden Studie wurde eine Basalmembranmatrix mit reduziertem Anteil an Wachstumsfaktoren verwendet (Growth factor reduced Matrigel, GFR BD MatrigelTM). Diese enthält laut Herstellerangaben eine VEGF-Konzentration von 1,25 ng/mL, die im vorliegenden Versuchsprotokoll in einer zweiten Gruppe durch Zugabe von rekombinantem VEGF um den Faktor 1000 auf 1 $\mu\text{g/ml}$ erhöht wurde (siehe Abb. 4). Die Beschichtung des Implantatgerüsts mit Wachstumsfaktoren in einer Matrix (z.B. MatrigelTM) stellt eine lokale Freisetzung sicher. Richardson et al. konnten damit einen Effekt auf die Vaskularisation von Polymer-Implantaten nachweisen (Richardson et al., 2001).

In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine signifikante Beschleunigung der Gefäßneubildung in den Gruppen mit beschichteten Implantaten gezeigt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Versuchen, die die Integration von Polyethylenimplantaten in das Wirtsgewebe durch die Beschichtung mit bFGF analysierten (Sabini et al., 2000).

Wie zuvor erwähnt, fanden Laschke et al. eine signifikant beschleunigte Vaskularisierung und eine höhere funktionelle Gefäßdichte bei den PLGA-Implantaten, die mit GFCM (*growth factor containing matrigel*, VEGF: 6 ng/mL) beschichtet wurden, im Vergleich zu Implantaten, die mit GFRM beschichtet waren oder unbeschichtet blieben (Laschke et al., 2008). Betrachtet man die absoluten Werte der funktionellen Gefäßdichte der GFCM-Implantate an Tag 10 und 14, so sind diese vergleichbar mit den Gefäßdichtewerten der drei Gruppen in der vorliegenden Studie. Für die beschleunigte Vaskularisierung der GFCM-beschichteten PLGA-Implantate in der Studie von Laschke et al. aus dem Jahr 2006 könnten andere Eigenschaften des verwendeten Implantatmaterials und ein deutlich größeres Porenlumen (PLGA: 380µm, poröses Polyethylen 100-200µm) ausschlaggebend sein, dem ebenfalls Bedeutung beim Angiogeneseprozess zukommt (Wake et al., 1994). In Anbetracht des aus vielen vorhergehenden Studien abgeleiteten Zeitrahmens von zwei Wochen, innerhalb der die maßgeblichen angiogenetischen Prozesse ablaufen (Druecke et al., 2004; Laschke et al., 2008; Rücker et al., 2006), lässt sich so schlussfolgern, dass sich die Vaskularisation von nicht-beschichteten porösen Polyethylenimplantaten bereits sehr schnell vollzieht und die Möglichkeiten, diesen Vorgang noch zu beschleunigen daher begrenzt zu sein scheinen.

2.2 *In vivo*-Untersuchung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Abhängig vom Implantatmaterial konnten unterschiedliche initiale entzündliche Gewebereaktionen auf Fremdmaterialien beobachtet werden, wenn man die Adhärenz von Leukozyten am Endothel als einen maßgeblichen Messparameter verwendet: Die maximale entzündliche Leukozyten-Endothelzellinteraktion fand bei *Ultrapro composite mesh* (Ethicon Products, Norderstedt) -Implantaten nach 20-24 h statt (Laschke, Haufel et al., 2005). Bei PLGA-Implantaten (Rücker et al., 2006) fand diese nach 6 Tagen und bei Kalzium-Phosphat-Implantaten nach 10 Tagen statt (Rücker et al., 2008). In der vorliegenden Studie wurde die erste *In vivo*-Messung 7 Tage nach Implantation durchgeführt, demzufolge wurden keine Messwerte in der Phase der initial auftretenden Ödeme und Blutungen erhoben, die am Beginn der Angiogenese normalerweise beobachtet werden.

Die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothel kann Zellschäden an der Gefäßoberfläche zur Folge haben, da aktivierte Leukozyten zytotoxische Substanzen freisetzen (Fantone & Ward, 1982). Ein daraus resultierender Verlust der Oberflächenintegrität geht einher mit einer erhöhten mikrovaskulären Gefäßpermeabilität, die durch Extravasation von Makromolekülen, hauptsächlich im Bereich der postkapillären Venolen, gekennzeichnet ist (Siflinger-Birnboim et al., 1992).

Man nimmt an, dass die Implantatoberfläche in dieser initialen Phase schon bald nach Einbringen des Implantats mit einer Proteinschicht überzogen wird, die zu einer Aktivierung von Makrophagen führt. Diese induzieren eine Überexpression spezifischer endothelialer Oberflächenliganden (Klosterhalfen B, 2003; Rosch et al., 2003; Tang et al., 1998; van Luyn et al., 1998). In Folge treten die aktivierten Leukozyten mit dem Endothel in Kontakt, was sich als *Rolling* entlang der Endotheloberfläche beschreiben lässt (Rosch et al., 2003; Tang et al., 1998; van Luyn et al., 1998). Diese von Selektinen regulierte Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel wird als Voraussetzung für eine spätere Adhärenz der Leukozyten an der Endotheloberfläche angesehen, die wiederum durch verschiedene Integrine gesteuert wird (Munro, 1993).

Rücker und Kollegen beobachteten in einer 2008 veröffentlichten Studie zur Biokompatibilität und Vaskularisierung unterschiedlicher Kalzium-Phosphat-Implantate einen leichten Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten. Gleichzeitig zeigte sich keine Veränderung der Anzahl der rollenden Leukozyten in allen beobachteten Rückenhautkammern mit Implantat im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Kammern ohne Kalzium-Phosphat-Implantate (Rücker et al., 2008). Dies führten sie auf die einsetzende Vaskularisation der Implantate und die damit einhergehende Freisetzung von VEGF zurück, da VEGF eine höhere Ausschüttung des Integrins ICAM-1 zur Folge hat, das die Leukozytenadhäsion am Endothel reguliert (Croll et al., 2004). Somit scheint die initiale Entzündungsreaktion mit Ödembildung und petechialen Einblutungen als frühe Phase der Angiogenese vor allem mit einer Erhöhung der VEGF-Konzentration – früher auch bekannt als *Vascular Permeability Factor* - im Gewebe in Zusammenhang zu stehen. Somit könnte die initiale Entzündungsreaktion weitgehend einer vom Implantetmaterial unabhängigen unspezifischen Gewebereaktion entsprechen.

Die Messungen der vorliegenden Studie ergaben am Tag 7 nach Implantation allerdings vor allem in der Kontrollgruppe mit unbeschichteten Polyethylenimplantaten eine deutliche Adhärenz von Leukozyten am Endothel. Im Gegensatz dazu konnte zu diesem Zeitpunkt eine signifikant reduzierte Leukozyten-Endothelzellinteraktion in Form von adhären

Leukozyten in der Gruppe mit ECM/VEGF-beschichteten Implantaten beobachtet werden. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen zeigte die Messung der adhärenenten Leukozyten dann gleich niedrige Werte in allen drei Gruppen.

Aktuelle klinische Beobachtungen und histopathologische Befunde berichten von Fremdkörperreaktionen bei Verwendung von PPE Implantaten für craniofaziale Augmentationsplastiken: Gosau et al. wiesen in Einzelfällen bei unbeschichteten PPE-Implantaten eine Entzündungsreaktion mit Fremdkörperriesenzellen und sogar Resorptionszonen nach (Gosau et al., 2006). Im Gegensatz dazu war in der hier vorliegenden Studie ein erheblicher Rückgang der initialen Entzündungsreaktion messbar. Hinweise auf eine mögliche Resorption des Biomaterials lassen sich zumindest aus anderen klinischen Langzeitbeobachtungen nicht unmittelbar ableiten. So berichtete Yaremchuk in einer der größten klinischen Serien eine gute Biokompatibilität der PPE-Implantate bei der Rekonstruktion von Gesichtsanteilen (Yaremchuk, 2003). Die Patienten wurden über einen Zeitraum von durchschnittlich 27 Monaten nachuntersucht. Die klinischen Ergebnisse reichten von der initialen postoperativen Einheilphase bis hin zu einer Zeitspanne von 11 Jahren. Von den 370 PPE –Implantate, die in 178 Operationen bei 162 Patienten eingesetzt wurden, mussten bei dieser Untersuchung lediglich 10% nachoperiert werden.

Auf welche Weise die in dieser Studie verwendete Extrazellulärmatrix mit erhöhter lokaler VEGF-Konzentration die Entzündungsreaktion bei beschichteten Implantaten in dieser frühen Phase verhindert, kann nur vermutet werden: Benjamin et al. berichten, dass VEGF als *survival factor* maßgeblich für die Differenzierung und das Überleben von neu entstehenden Gefäßen verantwortlich ist (Benjamin et al., 1998). Außerdem wird angenommen, dass VEGF eine wichtige Rolle bei der Granulationsgewebekonstruktion und der definitiven Integration von Biomaterial in das umgebende Gewebe spielt (Karayiannakis et al., 2003). Fehlt diese *Survival factor*-Funktion durch VEGF in der Frühphase, könnten noch nicht vollständig differenzierte Gefäße wieder degenerieren und lokal erhöhte Leukozyten-Endothelzellinteraktionen hervorrufen.

2.3 Dynamische Desintegrationskraft

Nur sehr wenige Studien über die mikrovaskuläre Integration von Biomaterialien geben zufriedenstellend Aufschluss über funktionelle Parameter und die tatsächliche mechanische Integration der Implantate *in situ* (Laschke, Haufel et al., 2005; Menger, Pelikan et al., 1992; Menger, Walter et al., 1990). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie durch die Messung der dynamischen Desintegrationskraft versucht, einen Parameter zu messen, der auch einen

Anhaltspunkt über die biomechanische Integration der Implantate im umgebenden Gewebe gibt. Die porösen Polyethylenimplantate wurden an einer Ecke mit einem Polyamidfaden fixiert. Durch die Wahl eines möglichst feinen Fadens mit einer kleinen Nadel und durch die Perforation des Implantates konnte eine weitgehend atraumatische Fixierung des Fadens am Implantat *in situ* erreicht werden.

In allen drei Gruppen dieser Studie konnte so bereits nach einem Zeitraum von 14 Tagen eine gute mechanische Integration der Implantate in das umliegende Gewebe nachgewiesen werden. Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, erscheint die unterschiedlichen initialen Entzündungsreaktionen zumindest bis zum Beobachtungszeitpunkt nach 14 Tagen nicht funktionell relevant zu sein. Weitergehende Studien müssen klären inwiefern verzögerte Unverträglichkeitsreaktionen oder gar eine später einsetzende Resorption (Gosau et al.) von funktioneller Bedeutung bei diesem Biomaterial sein könnten.

2.4 Ausblick

Die Tatsache, dass in allen drei Gruppen eine nachweisbare mechanische Integration im umgebenden Gewebe durch den beobachteten Angiogeneseprozess stattfand, lässt den Schluss zu, dass die so entstehende Gefäßversorgung einen Zugang von immunkompetenten Zellen zum Implantat gewährleistet und somit eine adäquate Abwehrreaktion des Gewebes zu erwarten ist. Da sich dabei auch Leukozyten-Endothelzellreaktionen mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* darstellen und untersuchen lassen (Laschke, Kerdudou et al., 2005), ergeben sich weitere Ansätze, die auf eine Modulation der initialen Entzündungsreaktion beim implantierten Biomaterial abzielen. Eine Verwendung von Steroiden erwies sich allerdings als nicht zielführend (Ehrmantraut et al., 2010).

In unserer Arbeitsgruppe werden im Gegensatz dazu gegenwärtig die Effekte von TNF α – Antagonisten eruiert. Geht man bei den subakuten Abstoßungen von porösen Polyethylen-Implantaten von einer Typ IV Reaktion nach Coombs und Gell des Wirtsgewebes infolge der Implantation eines PEE-Körpers und einer damit verbundenen Entzündungs- bzw. Abstoßungsreaktion aus, könnte ein kompetitiver Antagonist von TNF α durch Hemmung dieser proinflammatorischen Zytokine Einfluss auf die initiale Entzündungsreaktion nehmen und damit eine nachhaltig erfolgreiche Implantation ermöglichen.

V Zusammenfassung

Eine rasch einsetzende, schnell fortschreitende Vaskularisierung und eine möglichst niedrige Entzündungsreaktion des Wirtsgewebes sind zwei der entscheidenden Voraussetzungen für die erfolgreiche Implantation von Biomaterialien in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie. Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb zu untersuchen, ob eine Beschichtung von porösen Polyethylenimplantaten (MEDPOR[®], Porengröße ~100-200µm) mit extrazellulären Matrixkomponenten (ECM; GFR BD MatrigelTM) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zu einer Verbesserung der Biokompatibilität führt.

Zu diesem Zweck wurden die Polyethylenimplantate (3 mm x 3 mm x 0,25 mm) mit ECM und VEGF beschichtet und in zuvor präparierte Rückenhautkammern bei C57/Bl6 Mäusen eingesetzt (n=6). Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten entweder unbeschichtete Implantate (n=6) oder Polyethylenimplantate, die ausschließlich mit ECM beschichtet waren (n=6). Mit Hilfe der *In vivo*-Fluoreszenzmikroskopie wurde die Entzündungsreaktion anhand der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die angiogenetische Aktivität über einen Zeitraum von zwei Wochen analysiert. Am Tag 14 wurde die mechanische Integration der Implantate durch die Messung der dynamischen Desintegrationskraft quantifiziert.

Die funktionelle Gefäßdichte, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und die Gefäßdurchmesser nahmen in allen Gruppen im Lauf des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen stetig zu und bewegten sich am Ende in Messbereichen, wie sie auch im normalen subkutanen Muskelgewebe der Versuchstiere gefunden werden können. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden in der Gruppe der ECM-beschichteten Implantate eine geringere Leukozytenadhärenz beobachtet, in der Gruppe der ECM/VEGF beschichteten Implantate war diese sogar signifikant reduziert. Doch auch in der Kontrollgruppe war die initiale Entzündungsreaktion nur vorübergehend. Die Messung der dynamischen Desintegrationskraft ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Studie konnte zeigen, dass die initiale Entzündungsreaktion bei PPE-Implantaten durch die Beschichtung mit ECM und VEGF signifikant reduziert werden kann. Die rasche Vaskularisation von porösen Polyethylenimplantaten und die mechanische Integration konnte durch den Einsatz von ECM und VEGF nicht verbessert werden. Die klinische Verwendung von Polyethylenimplantaten, die mit extrazellulären Matrixproteinen und VEGF in einer hohen lokalen Konzentration beschichtet sind, könnte eine hilfreiche Neuerung in der rekonstruktiven Chirurgie darstellen, vor allem in kritischen Arealen mit ungünstigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Implantatintegration, wie beispielsweise in chronisch entzündetem Gewebe.

VI Literaturverzeichnis

- Algire, G. H. (1943). An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst*, 4(1).
- Asaishi, K., Endrich, B., Gotz, A., & Messmer, K. (1981). Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res*, 41(5), 1898-1904.
- Baez, S. (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res*, 5(3), 384-394.
- Benjamin, L. E., Hemo, I., & Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125(9), 1591-1598.
- Berghaus, A. (1985). Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol*, 111(3), 154-160.
- Berghaus, A., Mulch, G., & Handrock, M. (1984). Porous polyethylene and proplast: their behavior in a bony implant bed. *Arch Otorhinolaryngol*, 240(2), 115-123.
- Berghaus, A., & Stelter, K. (2006). Alloplastic materials in rhinoplasty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 14(4), 270-277.
- Berghaus, A., Stelter, K., Naumann, A., & Hempel, J. M. Ear reconstruction with porous polyethylene implants. *Adv Otorhinolaryngol*, 68, 53-64.
- Bigham, W. J., Stanley, P., Cahill, J. M., Jr., Curran, R. W., & Perry, A. C. (1999). Fibrovascular ingrowth in porous ocular implants: the effect of material composition, porosity, growth factors, and coatings. *Ophthal Plast Reconstr Surg*, 15(5), 317-325.

- Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., & Goldstein, S. (1999). Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med*, 5(7), 753-759.
- Borgstrom, P., Torres Filho, I. P., & Hartley-Asp, B. (1995). Inhibition of angiogenesis and metastases of the Lewis-lung cell carcinoma by the quinoline-3-carboxamide, Linomide. *Anticancer Res*, 15(3), 719-728.
- Braun, T., Gratza, S., Becker, S., Schwentner, I., Stelter, K., Patscheider, M., et al. Auricular reconstruction with porous polyethylene frameworks: outcome and patient benefit in 65 children and adults. *Plast Reconstr Surg*, 126(4), 1201-1212.
- Buerkle, M. A., Pahernik, S. A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K., & Dellian, M. (2002). Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer*, 86(5), 788-795.
- Cardon, S. Z., Oestermeyer, C. F., & Bloch, E. H. (1970). Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res*, 2(1), 67-76.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4), 389-395.
- Choy, J. S., Mathieu-Costello, O., & Kassab, G. S. (2005). The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions. *Ann Biomed Eng*, 33(8), 1027-1033.
- Colantuoni, A., Bertuglia, S., & Intaglietta, M. (1984). Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp*, 3(1), 13-28.
- Colton, C. K. (1995). Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*, 4(4), 415-436.

- Croll, S. D., Ransohoff, R. M., Cai, N., Zhang, Q., Martin, F. J., Wei, T., et al. (2004). VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Exp Neurol*, 187(2), 388-402.
- Dellian, M., Witwer, B. P., Salehi, H. A., Yuan, F., & Jain, R. K. (1996). Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol*, 149(1), 59-71.
- Dobrin, P. B. (1996). Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings. *J Surg Res*, 61(2), 413-415.
- Druecke, D., Langer, S., Lamme, E., Pieper, J., Ugarkovic, M., Steinau, H. U., et al. (2004). Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A*, 68(1), 10-18.
- Ehrmantraut, S., Laschke, M. W., Merkel, D., Scheuer, C., Willnecker, V., Meyer-Lindenberg, A., et al. (2010). Perioperative steroid administration inhibits angiogenic host tissue response to porous polyethylene (Medpor) implants. *Eur Cell Mater*, 19, 107-116.
- Eichhorn, M. E., Luedemann, S., Strieth, S., Papyan, A., Ruhstorfer, H., Haas, H., et al. (2007). Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer Biol Ther*, 6(6), 920-929.
- Endrich, B., Asaishi, K., Gotz, A., & Messmer, K. (1980). Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*, 177(2), 125-134.
- Endrich, B., Hammersen, F., Gotz, A., & Messmer, K. (1982). Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst*, 68(3), 475-485.

- Fantone, J. C., & Ward, P. A. (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol*, *107*(3), 395-418.
- Folkman, J., & Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, *138*(4), 745-753.
- Franke, N., & Endrich, B. (1983). [Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]. *Anasth Intensivther Notfallmed*, *18*(6), 285-290.
- Franke, N., Endrich, B., Laubenthal, H., Peter, K., & Messmer, K. (1982). [The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]. *Anasth Intensivther Notfallmed*, *17*(1), 11-14.
- Goldberg, R. A., Dresner, S. C., Braslow, R. A., Kossovsky, N., & Legmann, A. (1994). Animal model of porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg*, *10*(2), 104-109.
- Gosau, M., Schiel, S., Draenert, G. F., Ihrler, S., Mast, G., & Ehrenfeld, M. (2006). [Craniofacial augmentation with porous polyethylene implants (Medpor: first clinical results)]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, *10*(3), 178-184.
- Harris, A. G., Sinitsina, I., & Messmer, K. (2002). Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res*, *7*(3), 117-124.
- Herrmann, K. S. (1983). Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res*, *26*(2), 238-249.
- Karayiannakis, A. J., Zbar, A., Polychronidis, A., & Simopoulos, C. (2003). Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res*, *35*(6), 492-496.

- Kasahara, H., Tanaka, E., Fukuyama, N., Sato, E., Sakamoto, H., Tabata, Y., et al. (2003). Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol*, *41*(6), 1056-1062.
- Katayama, T., Ikeda, Y., Handa, M., Tamatani, T., Sakamoto, S., Ito, M., et al. (2000). Immunoneutralization of glycoprotein Ibalph attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ Res*, *86*(10), 1031-1037.
- Kedem, A., Perets, A., Gamlieli-Bonshtein, I., Dvir-Ginzberg, M., Mizrahi, S., & Cohen, S. (2005). Vascular endothelial growth factor-releasing scaffolds enhance vascularization and engraftment of hepatocytes transplanted on liver lobes. *Tissue Eng*, *11*(5-6), 715-722.
- Klosterhalfen B, H. B., Rosch R, Junge K. . (2003). Biological response to mesh. *Eur Surg*(35), 16-20.
- Klyscz, T., Junger, M., Jung, F., & Zeintl, H. (1997). [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)*, *42*(6), 168-175.
- Kraft, C. N., Burian, B., Perlick, L., Wimmer, M. A., Wallny, T., Schmitt, O., et al. (2001). Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res*, *57*(3), 404-412.
- Kraft, C. N., Hansis, M., Arens, S., Menger, M. D., & Vollmar, B. (2000). Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res*, *49*(2), 192-199.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, *260*(5110), 920-926.

- Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., et al. (2006). Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*, 12(8), 2093-2104.
- Laschke, M. W., Haufel, J. M., Thorlacijs, H., & Menger, M. D. (2005). New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 74(4), 696-704.
- Laschke, M. W., Kerdudou, S., Herrmann, M., & Menger, M. D. (2005). Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis*, 191(3), 435-443.
- Laschke, M. W., Rucker, M., Jensen, G., Carvalho, C., Mulhaupt, R., Gellrich, N. C., et al. (2008). Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 85(2), 397-407.
- Lee, S., Maronian, N., Most, S. P., Whipple, M. E., McCulloch, T. M., Stanley, R. B., et al. (2005). Porous high-density polyethylene for orbital reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131(5), 446-450.
- Lehr, H. A., Leunig, M., Menger, M. D., Nolte, D., & Messmer, K. (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*, 143(4), 1055-1062.
- Leunig, M., Yuan, F., Menger, M. D., Boucher, Y., Goetz, A. E., Messmer, K., et al. (1992). Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res*, 52(23), 6553-6560.
- Massberg, S., Eisenmenger, S., Enders, G., Krombach, F., & Messmer, K. (1998). Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)*, 198(1), 23-35.

- Massberg, S., Enders, G., Matos, F. C., Tomic, L. I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., et al. (1999). Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*, 94(11), 3829-3838.
- Mendelsohn, M. (2005). Straightening the crooked middle third of the nose: using porous polyethylene extended spreader grafts. *Arch Facial Plast Surg*, 7(2), 74-80.
- Menger, M. D., Hammersen, F., & Messmer, K. (1992). In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 40(1), 19-25.
- Menger, M. D., Hammersen, F., Walter, P., & Messmer, K. (1990). Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg*, 38(3), 139-145.
- Menger, M. D., Jager, S., Walter, P., Hammersen, F., & Messmer, K. (1990). The microvasculature of xenogeneic transplanted islets of Langerhans. *Transplant Proc*, 22(2), 802-803.
- Menger, M. D., & Lehr, H. A. (1993). Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*, 14(11), 519-522.
- Menger, M. D., Pelikan, S., Steiner, D., & Messmer, K. (1992). Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol*, 263(6 Pt 2), H1901-1906.
- Menger, M. D., Walter, P., Hammersen, F., & Messmer, K. (1990). Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *Eur J Cardiothorac Surg*, 4(4), 191-196.
- Mohle, R., Green, D., Moore, M. A., Nachman, R. L., & Rafii, S. (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor

- by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2), 663-668.
- Munro, J. M. (1993). Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur Heart J*, 14 Suppl K, 72-77.
- Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S., & Messmer, K. (1995). Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp*, 15(5), 244-249.
- Norrby, K. (1997). Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *Apmis*, 105(6), 417-437.
- Pandit, A. S., Feldman, D. S., Caulfield, J., & Thompson, A. (1998). Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth Factors*, 15(2), 113-123.
- Papenfuss, H. D., Gross, J. F., Intaglietta, M., & Treese, F. A. (1979). A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res*, 18(3), 311-318.
- Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117, 3-32.
- Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., & Cohen, S. (2003). Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 65(4), 489-497.
- Pinney, E., Liu, K., Sheeman, B., & Mansbridge, J. (2000). Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity. *J Cell Physiol*, 183(1), 74-82.
- Povlishock, J. T., Rosenblum, W. I., Sholley, M. M., & Wei, E. P. (1983). An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol*, 110(2), 148-160.

- Reed, M. W., & Miller, F. N. (1988). Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res*, 36(1), 104-107.
- Riabikhin, A. W., Walgenbach, K. J., Martiny-Baron, G., Bittner, K., Bannasch, H., Seifer, B., et al. (2000). Increased three-dimensional endothelial growth in a collagen matrix following addition of recombinant VEGF and liposomal gene transfer with VEGF-165. *Cells Tissues Organs*, 166(16).
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec*, 264(4), 317-324.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., & Dammacco, F. (1996). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 40(6), 1189-1197.
- Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., & Mooney, D. J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 19(11), 1029-1034.
- Risau, W. (1997). Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 336(671).
- Romanoff, A. L. (1952). Membrane growth and function. *Ann N Y Acad Sci*, 55(2), 288-301.
- Romo, T., 3rd, & Reitzen, S. D. (2008). Aesthetic microtia reconstruction with Medpor. *Facial Plast Surg*, 24(1), 120-128.
- Rosch, R., Junge, K., Schachtrupp, A., Klinge, U., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2003). Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res*, 35(3), 161-166.
- Rücker, M., Laschke, M. W., Junker, D., Carvalho, C., Schramm, A., Mulhaupt, R., et al. (2006). Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27(29), 5027-5038.

- Rücker, M., Laschke, M. W., Junker, D., Carvalho, C., Tavassol, F., Mulhaupt, R., et al. (2008). Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A*, 86(4), 1002-1011.
- Sabini, P., Sclafani, A. P., Romo, T., 3rd, McCormick, S. A., & Cocker, R. (2000). Modulation of tissue ingrowth into porous high-density polyethylene implants with basic fibroblast growth factor and autologous blood clot. *Arch Facial Plast Surg*, 2(1), 27-33.
- Saetzler, R. K., Jallo, J., Lehr, H. A., Philips, C. M., Vasthare, U., Arfors, K. E., et al. (1997). Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem*, 45(4), 505-513.
- Sandison, J. (1924). A new method for the microscopic study of living growing tissue by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec*(28), 281-287.
- Schwarz, E. R., Speakman, M. T., Patterson, M., Hale, S. S., Isner, J. M., Kedes, L. H., et al. (2000). Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol*, 35(5), 1323-1330.
- Sewell, I. A. (1966). Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat*, 100(Pt 4), 839-856.
- Shaw, J. P., Chuang, N., Yee, H., & Shamamian, P. (2003). Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res*, 109(1), 37-42.
- Shea, L. D., Smiley, E., Bonadio, J., & Mooney, D. J. (1999). DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 17(6), 551-554.

- Siflinger-Birnboim, A., Goligorsky, M. S., Del Vecchio, P. J., & Malik, A. B. (1992). Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Lab Invest*, 67(1), 24-30.
- Simons, M., Bonow, R. O., Chronos, N. A., Cohen, D. J., Giordano, F. J., Hammond, H. K., et al. (2000). Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 102(11), E73-86.
- Steinbauer, M., Harris, A. G., Abels, C., & Messmer, K. (2000). Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg*, 385(4), 290-298.
- Stelter, K., Strieth, S., & Berghaus, A. (2007). Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*, 45(4), 325-331.
- Strieth, S., Eichhorn, M. E., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., et al. (2004). Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer*, 110(1), 117-124.
- Strieth, S., Eichhorn, M. E., Sutter, A., Jonczyk, A., Berghaus, A., & Dellian, M. (2006). Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer*, 119(2), 423-431.
- Strieth, S., von Johnston, V., Eichhorn, M. E., Enders, G., Krasnici, S., Thein, E., et al. (2005). A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo. *Transplantation*, 79(4), 392-400.
- Tabata, Y., Miyao, M., Yamamoto, M., & Ikada, Y. (1999). Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 10(9), 957-968.

- Tang, L., Jennings, T. A., & Eaton, J. W. (1998). Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8841-8846.
- Tangelder, G. J., Slaaf, D. W., & Reneman, R. S. (1982). Fluorescent labeling of blood platelets in vivo. *Thromb Res*, 28(6), 803-820.
- Taniyama, Y., Morishita, R., Aoki, M., Nakagami, H., Yamamoto, K., Yamazaki, K., et al. (2001). Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther*, 8(3), 181-189.
- Vajkoczy, P., Menger, M. D., Simpson, E., & Messmer, K. (1995). Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation*, 60(2), 123-127.
- Vajkoczy, P., Ullrich, A., & Menger, M. D. (2000). Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia*, 2(1-2), 53-61.
- van Luyn, M. J., Khouw, I. M., van Wachem, P. B., Blaauw, E. H., & Werkmeister, J. A. (1998). Modulation of the tissue reaction to biomaterials. II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T-cell-deficient rats. *J Biomed Mater Res*, 39(3), 398-406.
- Vollmar, B., Laschke, M. W., Rohan, R., Koenig, J., & Menger, M. D. (2001). In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol*, 159(5), 1661-1670.
- Vollmar, B., Schmits, R., Kunz, D., & Menger, M. D. (2001). Lack of in vivo function of CD31 in vascular thrombosis. *Thromb Haemost*, 85(1), 160-164.
- Wake, M. C., Patrick, C. W., Jr., & Mikos, A. G. (1994). Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. *Cell Transplant*, 3(4), 339-343.

- Warren, B. A., Shubik, P., Wilson, R., Garcia, H., & Feldman, R. (1978). The microcirculation in two transplantable melanomas of the hamster. I. In vivo observations in transparent chambers. *Cancer Lett*, 4(2), 109-116.
- Wellisz, T. (1993). Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesthetic Plast Surg*, 17(4), 339-344.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242-248.
- Yaremchuk, M. J. (2003). Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg*, 111(6), 1818-1827.
- Yarlagadda, P. K., Chandrasekharan, M., & Shyan, J. Y. (2005). Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*, 15(3), 159-177.

VII Anhang

1. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalarbeit

Strieth, S., Weger, T., Bartesch, C., Bittmann, P., Stelter, K., & Berghaus, A.

Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF.

J Biomed Mater Res A 2010, 93(4), 1566-1573.

Vorträge und Poster

1) **Strieth S, Weger T, Bartesch C, Bittmann P, Stelter K, Berghaus A:**

Effekte von Beschichtungen poröser Polyethylenimplantate mit Extrazellulärmatrixkomponenten auf die Integration in vivo.

(Vortrag, 80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., 20.-24.05.2009, Rostock)

German Medical Science GMS Publishing House; 2009. Doc09hnod559

In: Abstractband zur 80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Rheinware Verlag, Mönchengladbach, ISBN: 978-3-93897531-8, p. 216

2) **Strieth S, Weger T, Bartesch C, Bittmann P, Stelter K, Berghaus A:**

Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF

[Poster, Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V.; 08.-10.10.2009, Bern (Schweiz)]

J Vasc Res 2009, 46 (Suppl. 3):42

3) **Strieth S:** *In vivo*-Analyse der mikrovaskulären Integration von porösen

Polyethylen-Implantaten für die plastisch-rekonstruktive Gesichtschirurgie.

(Vortrag Minisymposium „Verträglichkeit von Biomaterialien am Menschen“, 29.11.2006, München)

4) Strieth S: Experimentelle Analyse der Integration von beschichteten porösen Polyethylen-Implantaten für die plastisch-rekonstruktive Gesichtschirurgie *in vivo*.

(Vortrag Minisymposium „Verträglichkeit von Biomaterialien am Menschen“, 14.11.2007, München)

5) Strieth S: Effekte von Beschichtungen poröser Polyethylenimplantate mit Extrazellulärmatrixkomponenten auf die mikrozirkulatorische und mechanische Integration *in vivo*

(58. Tagung der Oto-Rhino-Laryngologischen Gesellschaft zu München e.V. 01.12.2007, München)

2. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med S. Strieth durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken, deren Hilfe und Unterstützung maßgeblich zur Entstehung und zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu aller erst möchte ich PD Dr. med. Sebastian Strieth meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Er hat mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe einen Zugang zur experimentellen Forschung und zu anspruchsvollem, wissenschaftlichen Arbeiten ermöglicht. Seine hervorragende Betreuung und unermüdliche Unterstützung haben mich über die gesamte Dauer meiner Arbeit begleitet. Mit seinen vielen konstruktiven wie kritischen Gedanken und Denkanstößen, sowie seinem Engagement hat er einen wesentlichen Teil zum Gelingen beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei C. Bartsch und S. Lüdemann für die vielen nützlichen Tipps zur Kammerpräparation und Fluoreszenzmikroskopie bedanken. Zusammen mit S. Becker gilt ihnen ein herzliches Dankeschön für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe.

Zum Schluss möchte ich auch meinen Eltern von ganzem Herzen danken. Dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mir durch ihre grenzenlose Unterstützung ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen. Ich verdanke ihnen mehr, als ich in Worte fassen könnte!