

Aus dem  
Institut für Chirurgische Forschung  
am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl  
und der  
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**DIE BEDEUTUNG DES FIBRINOLYTISCHEN SYSTEMS FÜR DIE  
BIOINTEGRATION VON IMPLANTATEN AUS PORÖSEM  
POLYETHYLEN**



**DISSERTATION**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von:  
Maximilian Emanuel Thomas Hessenauer  
aus Würzburg

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

**Mitberichterstatter:** PD Dr. med. Gerson Mast  
PD Dr. med. Michael Vogeser  
PD Dr. med. Gerhard Kuhnle

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** PD Dr. med. Christoph Andreas Reichel

**Dekan:** Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung:** 18.07.2019

# Eidesstattliche Versicherung

Hessenauer, Maximilian Emanuel Thomas

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

## **Die Bedeutung des fibrinolytischen Systems für die Biointegration von Implantaten aus Porösem Polyethylen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Erlangen, den 03.08.2019

---

Ort, Datum

Maximilian Hessenauer

---

Unterschrift Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1. Poröses Polyethylen in der rekonstruktiven und ästhetischen Kopf-Hals-Chirurgie .....	7
1.1. Klinische Anwendungsbereiche von PPE-Implantaten .....	7
1.2. Limitationen im klinischen Einsatz von PPE-Implantaten .....	8
2. Mechanismen der Biointegration von PPE-Implantatmaterial.....	9
2.1. Leukozytenrekrutierung .....	9
2.2. Angiogenese.....	11
2.3. Bindegewebige Integration .....	13
3. <i>Tissue engineering</i> an PPE-Implantatmaterial .....	13
4. Zielmechanismen für <i>tissue engineering</i> an PPE .....	15
4.1. Das fibrinolytische System.....	15
4.2. Vitronektin.....	17
5. Fragestellung.....	19
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
1. Vorbemerkung .....	20
2. Versuchstiere.....	20
3. Narkose .....	21
4. Modell der transparenten Rückenhautkammer .....	22
4.1. Kammerdesign .....	22
4.2. Chirurgische Technik .....	23
5. Schwanzvenenkatheter.....	25
6. Implantate.....	26
7. Implantatbeschichtung.....	27
8. Intravitalmikroskopie .....	27
9. Analyse der Intravitalmikroskopischen Untersuchungen .....	30
10. Messung der Gesamtleukozytenzahl .....	31
11. Messung der strukturellen Gewebsintegration .....	32
12. Konfokalmikroskopie.....	33
13. Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	34
14. Migration Assay .....	34
15. Statistik.....	35
16. Versuchsprotokoll .....	35

<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
1. Ergebnisse urokinase-type Plasminogen Activator, tissue Plasminogen Activator und Plasminogen Activator Inhibitor-1.....	38
1.1. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Biointegration von PPE-Implantaten.....	38
1.1.1. Verteilungsmuster von uPA, tPA und PAI-1 im PPE-Biomaterial 14 Tage nach Implantation .....	38
1.1.2. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten .....	39
1.1.3. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten.....	44
1.1.4. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten.....	47
1.1.5. Chemotaktische Eigenschaften von uPA, tPA und PAI-1 auf migrierende Endothelzellen .....	48
1.2. Auswirkung einer bioaktiven Oberflächenbeschichtung von PPE mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1.....	49
1.2.1. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten.....	49
1.2.2. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten.....	52
1.2.3. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten.....	54
1.2.4. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA oder tPA ohne proteolytische Aktivität auf die Biointegration von PPE-Implantaten .....	55
2. Ergebnisse Vitronectin .....	59
2.1. Bedeutung von endogenem VN für die Biointegration von PPE-Implantaten .....	59
2.1.1. Verteilungsmuster des matrizellulären Bindeproteins VN nach Implantation von PPE-Implantaten .....	59
2.1.2. Bedeutung von endogenem VN für die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten.....	61
2.1.3. Bedeutung von endogenem VN für Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten .....	64
2.1.4. Bedeutung von endogenem VN für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten.....	65
2.2. Auswirkung einer bioaktiven Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinantem VN .....	65
2.2.1. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem VN auf die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten .....	65
2.2.2. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem VN auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten.....	68

---

2.2.3. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem VN auf die strukturelle Gewebsintegration von PPE .....	70
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>71</b>
1. Überlegungen zum <i>tissue engineering</i> von PPE-Implantaten für den Einsatz in der kraniofazialen Chirurgie .....	71
2. Diskussion von Material und Methoden .....	72
2.1. Relevante Parameter bei der Biointegration von Implantaten.....	72
2.2. Intravitalmikroskopie und transparente Rückenhautkammer.....	72
2.3. Versuchstiere.....	74
2.4. Konfokalmikroskopie und Zwei-Photonen-Mikroskopie .....	75
2.5. Chemotaxis-Assay.....	76
2.6. Messung der strukturellen Gewebsintegration .....	76
2.7. Matrigel-basiertes Beschichtungsprotokoll für PPE-Implantate .....	77
3. Ergebnisse uPA, tPA, PAI-1.....	78
3.1. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Biointegration von PPE-Implantaten.....	78
3.2. Bedeutung einer Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinanten uPA, tPA und PAI-1 .....	82
3.3. Bedeutung der proteolytischen Aktivität für die Effekte von uPA und tPA auf die Biointegration von PPE-Implantaten .....	84
4. Ergebnisse Vitronektin .....	86
4.1. Bedeutung von endogenem VN für die Biointegration von PPE-Implantaten .....	86
4.2. Bedeutung einer Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinatem VN für deren Biointegration .....	89
5. Ergebniszusammenfassung und Implikationen für eine klinische Weiterentwicklung.....	90
<b>V. Literatur .....</b>	<b>94</b>
<b>VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>VII. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>VIII. Publikationen.....</b>	<b>112</b>
<b>IX. Danksagung.....</b>	<b>115</b>

## **I. Einleitung**

### **1. Poröses Polyethylen in der rekonstruktiven und ästhetischen Kopf-Hals-Chirurgie**

#### **1.1. Klinische Anwendungsbereiche von PPE-Implantaten**

Rekonstruktive Eingriffe nach Traumata oder Tumorresektion erfordern ebenso wie ästhetische Eingriffe im Bereich der kraniofazialen Chirurgie oft den (Wieder-)aufbau von struktur- und konturgebenden Knorpel-/Knochenanteilen des Gesichtsschädels [1]. Dafür bietet sich neben der Verwendung von autologem Donormaterial die Verwendung von alloplastischen Ersatzmaterialien an [2]. Der Einsatz von autologem Material ist, wenn er auch viele Vorteile bietet, für den Patienten meist mit einer erhöhten Morbidität durch Hebedefekte im Spenderareal sowie mit einer größeren Eingriffsdauer verbunden und erfordert außerdem oft eine komplexe mehrstufige Operationsplanung mit dementsprechend langwierigen Heilungsverläufen [3, 4]. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Biomaterialien zur Augmentation von Gewebsdefekten des knöchernen/knorpeligen Stützgewebes weit verbreitet [1].

Besonders erfolgreich werden Biomaterialien aus Porösem Polyethylen (PPE) eingesetzt. Dabei erlaubt die Struktur des Implantatmaterials mit einer Porengröße von 100–250 µm das Einwachsen von Bindegewebsstraßen, das Einsprossen von Gefäßen und letztendlich nach einer Einheilungsphase von etwa 2 Wochen eine funktionale Gewebsintegration des Biomaterials [2, 5]. PPE, kommerziell erhältlich unter dem Handelsnamen medpor® (Stryker Corporation, Kalamazoo, MI, USA), stellt eines der am weitesten verbreiteten und seit Jahrzehnten standardmäßig eingesetzten Biomaterialien zum Knorpel-Knochenersatz im Bereich der kraniofazialen Chirurgie dar [1]. Das Biomaterial ist in zahlreichen Varianten für verschiedene Einsatzbereiche im klinischen Alltag verfügbar. Vorgefertigte Implantate werden unter anderem als Orbitabodenersatz [6], zur Ohrrekonstruktion [7] und zur Augmentation und Modifikation des Gesichtsschädels angeboten [8]. Außerdem kann PPE intraoperativ einfach zugeschnitten, geformt, modifiziert und der spezifischen Anwendung angepasst werden oder es

können sogar für bestimmte Einsatzbereiche besonders auf die Bedürfnisse des Patienten angepasste *custom-made* Implantate bezogen werden [2]. Grundsätzlich ist die Biokompatibilität des PPE-Biomaterials als exzellent zu bewerten und das Material wird seit mehr als 30 Jahren erfolgreich klinisch eingesetzt [9-11].

## 1.2. Limitationen im klinischen Einsatz von PPE-Implantaten

Trotz der hervorragenden Biokompatibilität von PPE zeigen klinische Erfahrungswerte, dass bestimmte Körperregionen als Implantatlager weniger geeignet sind und Komplikationen bei bestimmten Anwendungen häufig sind. Dabei umfasst das Komplikationsspektrum Dislokationen des Implantates aus dem vorgesehenen Implantatlager, Materialbruch, akute, subakute oder chronische Infektionen im Implantatbereich sowie ein Freiliegen des Implantatmaterials infolge einer insuffizienten Haut-Weichteil-Bedeckung [1, 12]. Oft ist in Folge dessen eine Entfernung des eingebrachten Implantatmaterials vonnöten. In der Literatur berichtete Komplikationsraten variieren je nach Anwendungsgebiet zwischen 5-20% [4, 8, 13-18]. Zu besonders komplikationsbehafteten Eingriffen zählen Operationen im Nasen-Rachenraum [16] sowie der Einsatz in beispielsweise durch Voroperationen oder Bestrahlung vernarbtem Gewebe [19]. Prinzipiell lässt sich feststellen, dass Komplikationen meist dann auftreten, wenn das Implantatbett in einem Bereich von natürlicherweise oder iatrogen verminderter Blutversorgung lokalisiert ist [19].

Bei einigen Anwendungsbereichen wird diese Problematik umgangen, indem die lokalen Haut-Weichteil-Verhältnisse durch lokoregionäre Lappenplastiken vor Einbringung des Biomaterials verbessert werden. So kommt beispielsweise bei der Ohrrekonstruktion mittels PPE eine temporoparietale, gefäßgestielte Gewebslappenplastik zum Einsatz, um eine adäquate Weichteilbedeckung des Implantatmaterials zu gewährleisten [7]. Allerdings ist ein solches Verfahren nur möglich, sofern eine hinreichend dimensionierte Lappenplastik im rekonstruierten Areal zur Verfügung steht, was die Applikationen bei Tumor- oder Traumarekonstruktionen und im anatomisch kleinräumigen Operationssitus limitiert.

## **2. Mechanismen der Biointegration von PPE-Implantatmaterial**

Von besonderer Bedeutung für eine erfolgreiche Integration von porösen Biomaterialien ist die frühe Phase der Gewebsintegration, während derer sich Blutgefäße und Bindegewebe in den Poren des Implantates bilden [20-22]. Gerade solange das Implantat noch nicht bindegewebig und vaskulär fest ins umliegende Gewebe integriert ist, besteht ein hohes Risiko für Komplikationen wie Infektion, Dislokation oder Abstoßung, welche eine Entfernung des Implantatmaterials notwendig machen können. Werden die Poren des Implantatmaterials vor einer funktionellen Gewebsintegration bakteriell besiedelt, so können Mikroorganismen den körpereigenen Abwehrmechanismen durch Formierung eines Biofilms entkommen und diese Komplikationen verursachen [23, 24]. Mit der Entwicklung von voll ausgebildeten Gefäßnetzwerk- und Bindegewebsstrukturen im Implantat wird es der körpereigenen Immunabwehr möglich, diese Komplikationen zu unterbinden. Zudem wird das Implantatmaterial bei Bedarf hierdurch einer systemischen Antibiotikatherapie zugänglich [1].

Im Allgemeinen werden somit eine schnelle strukturelle und vaskuläre Gewebsintegration sowie eine mäßige initiale Entzündungsreaktion als Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Biointegration von PPE-Biomaterialien angesehen [20, 22].

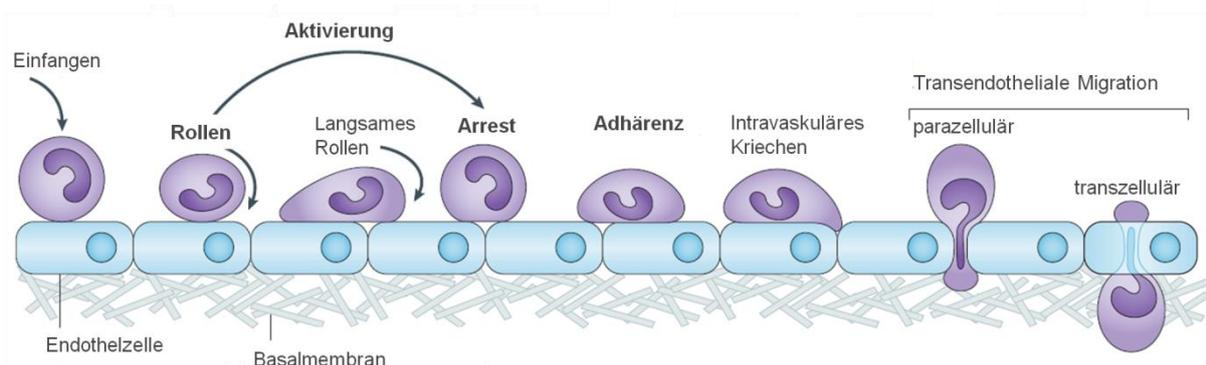
Sofort nach Implantation wird das Implantatmaterial mit den Proteinen des Wundexsudates eingekleidet [25-27]. Als erste zelluläre Komponenten werden Leukozyten aus dem Gefäßbett des umgebenden Implantatlagers rekrutiert [28]. Sodann erfolgt die vaskuläre Erschließung der Poren durch endotheliale *sprout*-Formierung sowie abschließend der bindegewebige Einbau des Implantatmaterials [22, 29].

### **2.1. Leukozytenrekrutierung**

Den ersten Schritt stellt bei der Wundheilung ebenso wie bei der Biointegration eines alloplastischen Implantatmaterials zunächst die Rekrutierung der Zellen des Immunsystems aus den

Mikrogefäßen des Wundbettes dar. Hierdurch werden eingedrungene Pathogene effektiv bekämpft sowie geschädigtes Gewebe abgeräumt und umgebaut [30, 31]. Diese Rekrutierungsprozesse finden im Bereich der postkapillären Venolen statt [32].

Durch infolge einer Gewebsschädigung freigesetzte proinflammatorische Faktoren, Chemokine und Zytokine erfolgt eine Aktivierung der Gefäßendothelzellen mit vermehrter luminaler Expression und Translokation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Hierdurch treten Leukozyten, vor allem vermittelt über Selektine und Integrine, in Kontakt mit den Endothelzellen und beginnen zunächst im Gefäßlumen in Flussrichtung des Blutstromes am Endothel entlang zu rollen [33-37]. Bei weiterer Leukozytenaktivierung durch auf dem Endothel präsentierte Chemokine kommt es zu einer Verlangsamung der Rollgeschwindigkeit und schlussendlich zu einer festen Adhärenz der Leukozyten am Gefäßendothel. Diese Vorgänge sind wiederum maßgeblich durch Integrine vermittelt [38-44]. Sodann erfolgt das Absuchen des Endothels durch die jeweiligen Leukozyten nach einer geeigneten Durchtrittsstelle für die Transmigration ins Gewebe. Dabei müssen Endothelzellschicht, Basalmembran sowie Perizyten-schicht durchdrungen werden [45, 46]. Im Anschluss folgen die Leukozyten bei der Migration durch das Interstitium Chemokingradienten, um den Ort der Gewebsschädigung zu erreichen (vergleiche Abbildung 1) [30, 32, 47-50].



**Abbildung 1:** Vereinfachte schematische Darstellung der Schritte der Leukozytenrekrutierung aus der postkapillären Venole ins entzündete Gewebe (modifiziert nach [30], siehe auch [32, 47-50]).

Bei der Transmigration durch die Gefäßwand ebenso wie bei der interstitiellen Migration ist das richtige Verhältnis von Proteolyse zur Antiproteolyse von entscheidender Bedeutung. Proteasen und deren Inhibitoren interagieren mit spezifischen Rezeptoren, medieren und modifizieren das lokale Zusammenspiel verschiedener Chemokine und ermöglichen dadurch die Zellmigration. In diesem Zusammenhang sind vor allem Matrix-Metalloproteinasen, Serin-Proteasen sowie deren Inhibitoren und Interaktionspartner von zentraler Bedeutung [51, 52]. Einen entscheidenden Beitrag hierzu liefern auch die Komponenten des Plasmin-Aktivierungssystems sowie das matrizelluläre Bindeprotein Vitronektin (VN) [53-60].

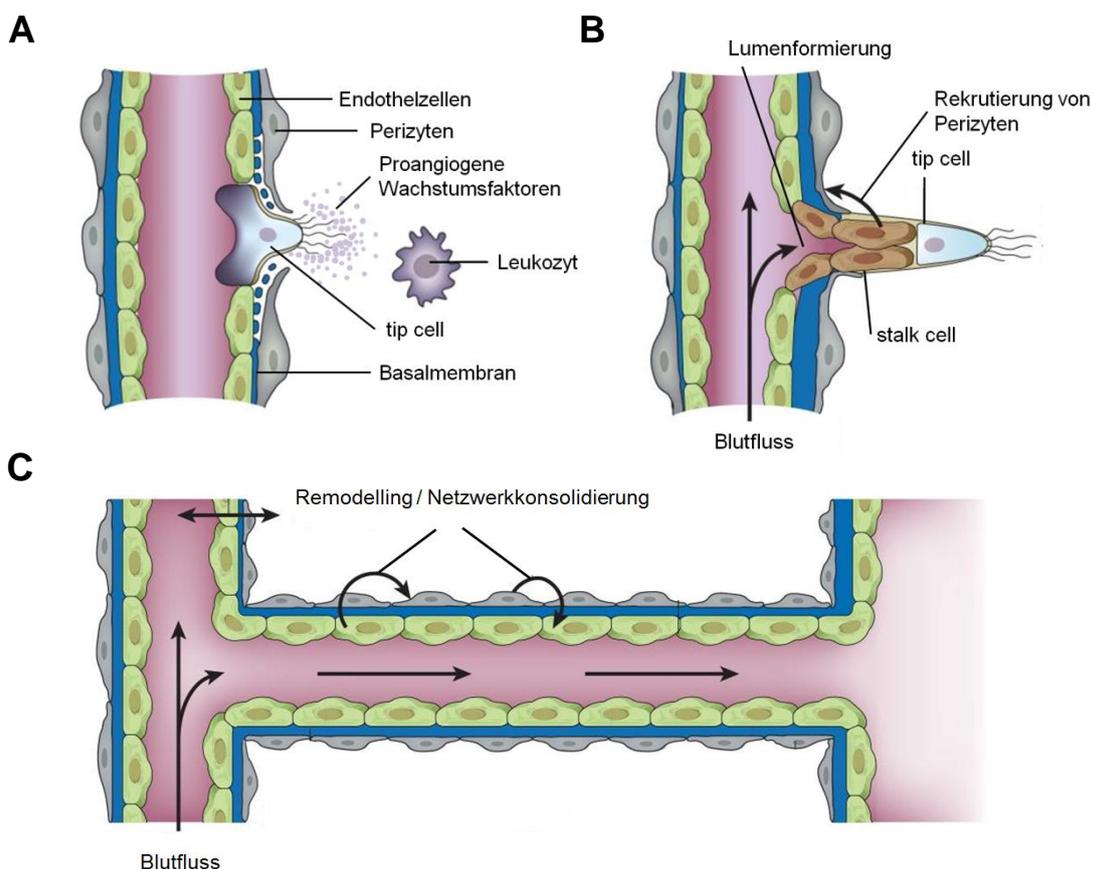
## 2.2. Angiogenese

Grundsätzlich gilt eine schnelle vaskuläre Erschließung des Implantatmaterials als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Biointegration von PPE. Im Adulten kann eine Neuformierung von Gefäßen einerseits über *sprouting* und andererseits über *splitting* erreicht werden. Beim *sprouting* findet eine Neuerschließung eines Gewebsareals durch Ausbildung eines neuen Gefäßastes, meist im Bereich der postkapillären Venolen, statt. Beim *splitting* hingegen wird ein bestehender Gefäßast aufgeteilt [20, 61-63]. In der Regel finden diese Prozesse im Rahmen der Angiogenese parallel statt, jedoch muss ein bisher nicht vaskulär erschlossenes Biomaterial zunächst mittels *sprouting* Anschluss an die Zirkulation finden, bevor Prozesse des vaskulären *remodeling* stattfinden können [22].

Unter dem Einfluss proangiogener Faktoren, welche beispielsweise von Leukozyten sezerniert oder durch Proteolyse aus der extrazellulären Matrix im umliegenden Gewebe freigesetzt werden, formiert sich aus residenten Endothelzellen der umliegenden Gefäße eine sogenannte *tip cell*, welche die Führungsrolle im folgenden vaskulären *sprouting* übernimmt. Typische proangiogene Faktoren bilden neben der Klasse des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), der Transforming Growth Factor (TGF beta), der Fibroblast Growth Factor (FGF) sowie das Angiopoetin-System (ANG/TIE) [64, 65]. Zudem beeinflussen zahlreiche weitere Mediatoren und Effektoren aus dem Bereich der Inflammation

und Wundheilung, auf welche im Folgenden noch näher eingegangen werden soll, die Gefäßneubildung [66-73].

Die *tip cell* vermag über Filopodia einen Gradienten von proangiogenen Faktoren zu ermitteln und somit die gerichtete Angiogenese zu dirigieren. Die Verlängerung des neu gebildeten Gefäßastes übernehmen die sogenannten *stalk cells*, ebenfalls aus dem Ursprungsgefäß rekrutierte Endothelzellen. Bei der Kommunikation zwischen *tip-* und *stalk cells* spielt der Delta-like 4 / notch-Pathway eine bedeutende Rolle. Nicht abschließend geklärt ist, ob *tip cells* die *stalk cells* durch gerichtete Migration ins Gewebe „ziehen“ oder die *tip cells* von den proliferierenden *stalk cells* durch das Gewebe „geschoben“ werden [64, 74, 75]. Parallel hierzu erfolgt die Formierung eines Lumens im sich neu formenden Gefäßast (vergleiche Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Prozesse beim endothelialen sprouting: A) Initiierung der Angiogenese und *tip cell* Formierung, B) Elongation des sprouts über *stalk cells*, Formierung des Lumens und Rekrutierung von Perizyten, C) Remodelling und Netzwerkkonsolidierung (modifiziert nach [59]).

Die Rolle von Perizyten sowie die zeitlichen Abläufe deren Proliferation und Migration bei den Prozessen des *sproutings* bleibt nach wie vor umstritten, jedoch ist die Umkleidung des Gefäßnetzwerkes mit Perizyten von essentieller Bedeutung für die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines funktionellen Gefäßnetzwerkes [76, 77].

Nach Etablierung einer funktionellen Gefäßperfusion erfolgt ein *remodeling* der neu gebildeten mikrovaskulären Gefäßnetzwerke sowie die Schaffung einer den lokalen Bedürfnissen angepassten Netzwerkarchitektur.

### **2.3. Bindegewebige Integration**

Im letzten Schritt der Biointegration erfolgt parallel zur Vaskularisation des Implantatmaterials die bindegewebige Verknüpfung und Vernetzung des alloplastischen Materials mit dem umgebenden Implantatlager. Dies ist von essentieller Bedeutung, um sekundäre Dislokationen des Implantates mit darauffolgender Implantatprotrusion und Implantatextrusion durch die Haut zu verhindern [78, 79]. Die Bildung von kollagenem und ossifizierendem Bindegewebe in den Implantatporen ist seit langem bekannt und sowohl tierexperimentell als auch anhand von explantierten Gewebeproben am menschlichen Patienten gut belegt [80-84]. Ausgehend vom umgebenden Wundgewebe werden Fibroblasten analog zu Endothelzellen zur Migration in die Poren des Implantatmaterials stimuliert. Diese sorgen über die Deposition von extrazellulären Matrixkomponenten, allen voran Kollagen, für den bindegewebigen Einbau des Implantatmaterials [85-88].

### **3. Tissue engineering an PPE-Implantatmaterial**

Aufgrund der zuvor beschriebenen Limitationen der Anwendung von PPE-Implantaten im Bereich der kraniofazialen Chirurgie kamen in den letzten Jahren verschiedene Ansätze aus dem Bereich des *tissue engineering* zur Verbesserung der Eigenschaften des Implantatmaterials

zum Einsatz. Erklärtes Ziel dabei war es, die Abläufe der höchst relevanten frühen Integrationsphase von PPE-Biomaterial zu verbessern und insbesondere zu beschleunigen, um das Zeitfenster, in dem Komplikationen, welche den Operationserfolg gefährden, auftreten können, zu verschmälern. Hiermit soll eine bessere Verträglichkeit und eine geringere Komplikationsrate insbesondere bei ungünstigen Primärvoraussetzungen für eine Biointegration des Implantatmaterials erreicht werden und somit der klinische Einsatzbereich dieses Implantatmaterials erweitert werden [23].

In diesem Zusammenhang wurden bisher verschiedene Ansätze verfolgt. Einerseits wurde das PPE-Implantatmaterial mit verschiedenen Zellpopulationen oder Bindegewebsbruchstücken vitalisiert. So konnte das Implantatmaterial erfolgreich mit zuvor isolierten Chondrozyten, Adipozyten und Fibroblasten vitalisiert werden, wobei jedoch nur eine eingeschränkte Verbesserung der Biokompatibilität erreicht werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vorbesiedelung des Implantatmaterials mit zuvor aus Fettgewebe isolierten mikrovaskulären Fragmenten möglich ist und *in vivo* zur Vaskularisation des Implantatmaterials beiträgt [20, 89-93]. Andererseits wurden bioaktive Beschichtungen mit Chemokinen und Wachstumsfaktoren (MALP-2, EGF, FGF, VEGF) erfolgreich zum Einsatz gebracht [23, 83, 94-96].

Allen diesen Ansätzen gemein ist, dass multiple exogene Faktoren in das System eingebracht werden. In der klinischen Anwendung wirft dies Fragen bezüglich der Sicherheit der vorgeschlagenen Verfahren auf [97, 98]. Außerdem sind die eingesetzten bioaktiven Beschichtungsprozesse mehrschrittig und äußerst komplex, was eine Anwendung im klinischen Alltag weiter erschwert [23]. Aus diesem Grund bestehen aktuelle Bestrebungen im Bereich des *tissue engineering*, mit minimaler Manipulation endogener biologischer Prozesse durch ein „*fine tuning*“ den Heilungserfolg zu beschleunigen. Dabei werden körpereigene Systeme zur Modulation der Wundheilung und Angiogenese insofern modifiziert, dass endogene Faktoren aktiviert bzw. verstärkt werden und somit durch einen minimalen Eingriff in biologische Prozesse eine Verbesserung der Gewebsintegration des Implantatmaterials erreicht wird [21, 89, 99].

Klinisch bereits erfolgreich eingesetzt wird ein Verfahren, bei dem PPE-Implantate für bestimmte Anwendungen mit oxydierter Zellulose und Patientenblut, das eine Vielzahl von unspezifischen Wirkfaktoren, unter anderem aus dem Bereich des fibrinolytischen Systems, enthält, beschichtet werden [100, 101].

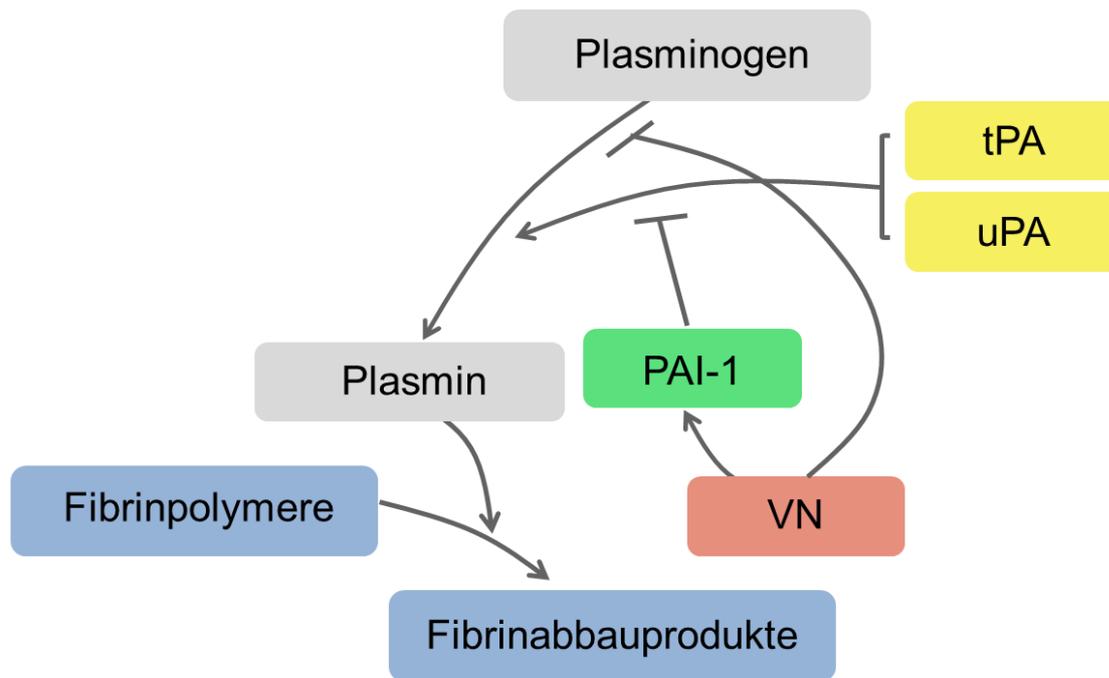
#### **4. Zielmechanismen für *tissue engineering* an PPE**

Die Biointegration eines alloplastischen Implantates stellt einen höchst komplexen Vorgang dar, bei dem eine Vielzahl von molekularen Mechanismen zum Tragen kommt. Besonderes Augenmerk soll hierbei im weiteren Verlauf auf Prozesse der Fibrinolyse im Wechselspiel mit immunologischen Reaktionen, Angiogenese und Wundheilung gelegt werden.

##### **4.1. Das fibrinolytische System**

Blutgerinnung, Entzündungsreaktion und Wundheilung sind drei biologische Prozesse, deren Interaktionen und Kooperation in den letzten Jahren immer deutlicher zu Tage treten. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Komponenten des fibrinolytischen Systems neben ihrem klassischen Aufgabenbereich, der Auflösung von Blutgerinnseln, bedeutende Funktionen bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen innehaben [48, 102-104].

Die Serin-Protease Plasmin bildet das Schlüsselenzym im fibrinolytischen System. Ihre primäre Aufgabe ist es, Fibrin-Polymere aufzuspalten und damit über Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Hämostase und Fibrinolyse eine suffiziente Gewebesperfusion sicherzustellen [105, 106]. Plasmin wird aus seinem Pro-Enzym Plasminogen durch proteolytische Aktivierung über seine Aktivatoren urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) und tissue Plasminogen Activator (tPA) freigesetzt [55, 105, 107]. Deren Aktivität ist maßgeblich durch den zur Klasse der Serpine gehörenden Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) reguliert (vergleiche Abbildung 3) [108].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Interaktionen im fibrinolytischen System (modifiziert nach [48]).

Neben dem klassischen Funktionsbereich im fibrinolytischen System wird die Bedeutung des Plasminogen-Aktivierungs-Systems bei nicht fibrinolytischen Prozessen wie Zellmigration, -adhäsion und -proliferation, Angiogenese sowie inflammatorischen Prozessen immer deutlicher [48, 66-71, 102, 103, 109-111]. Hierbei kommt zum Tragen, dass Plasmin, die Zielprotease des Plasminogen-Aktivierungs-Systems, Bestandteile der endothelialen Basalmembran wie Laminin, Thrombospondin und Fibronectin auftrennen kann und zudem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in ihre biologisch aktive Form überführt. Diese wiederum spalten zahlreiche weitere Strukturproteine und beeinflussen hierdurch Prozesse der perizellulären Proteolyse bei Zellmigration, -invasion, Inflammation und weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [72].

Jedoch sind auch weitere, von der Plasminaktivierung unabhängige, spezifische rezeptorvermittelte Funktionen der Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems bekannt. Hier ist beispielsweise anzuführen, dass uPA, vermittelt über den uPA-Rezeptor, chemotaktisch auf bestimmte Leukozytensubpopulationen wirkt und – hier jedoch unabhängig vom uPA-Rezeptor – Leukozyten im Bereich der Mikrozirkulation rekrutiert [59, 102]. tPA hingegen vermittelt

eine Leukozytenrekrutierung sowohl über proteolytische als auch über nicht-proteolytische Funktionen [103]. PAI-1 beeinflusst, vermittelt über die Interaktion mit VN, Zelladhäsion und Migration [53, 66, 112].

Weiterhin wurde in diesem Kontext bereits gezeigt, dass der Serin-Protease Plasmin aufgrund dieses facettenreichen Interaktionsprofils eine bedeutende Rolle bei Integrationsprozessen von Biomaterialien zukommt [113]. Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivierungs-Systems im Kontext der Biointegration von PPE wurde bis dato jedoch nicht näher betrachtet.

#### **4.2. Vitronektin**

Vitronektin (VN) ist ein multifunktionales Glykoprotein, welches das hämostatische System mit Zellfunktionen vaskulärer Zellen funktionell verknüpft [56, 114, 115]. Das Plasmaprotein wird zudem durch Extravasierung präferentiell in Bereichen einer Gewebsschädigung durch Trauma oder Entzündungsreaktionen angereichert [73, 114]. Dabei ist VN über eine Modulation von Zellmigration und –proliferation für viele Prozesse im Bereich von Entzündungsreaktionen, Angiogenese und Wundheilung von fundamentaler Bedeutung [60, 116]. Außerdem interagiert VN intensiv mit Plasminogen sowie dem Plasminogen-Aktivierungs-System, insbesondere PAI-1, uPA und dem uPA-Rezeptor, sowie vielen Wachstumsfaktoren aus dem Bereich Angiogenese und Wundheilung, wie beispielsweise VEGF, EGF, FGF sowie TGF-beta [57, 73, 116-120] (vergleiche Tabelle 1).

<b>Wachstumsfaktoren</b>
Epidermal Growth Factor (EGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Insulin-like Growth Factor II (IGF-II), IGF-binding protein 2-5 (IGFBP-2-IGFBP-5), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Transforming Growth Factor $\beta$ 1, 2 (TGF- $\beta$ 1, 2), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A), Angiopoietin-1, 2
<b>Chemokine</b>
Interleukin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, C-C Motiv Chemokine
<b>Proteasen/Inhibitoren</b>
Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1), Gelatinase A (MMP-2), Matrilysin (MMP-7), Matrix Metalloproteinase-26 (MMP-26), Plasminogen, Anti-Thrombin III
<b>Strukturproteine</b>
Fibrinogen, Integrin $\beta$ 1, 3, 6, 8, $\alpha$ 8, Kollagen $\alpha$ 1A, $\alpha$ 2A
<b>Rezeptoren</b>
Tumor necrosis factor receptor 11B (TNF-R IIB), urokinase type Plasminogen Activator Receptor (uPAR)

**Tabelle 1:** Ausgewählte, im Kontext von Inflammation, Angiogenese und Wundheilung relevante Interaktionspartner von VN (modifiziert nach [114]).

Die Funktion von VN – insbesondere im Wechselspiel mit dem Plasminogen-Aktivierungssystem – bei der funktionellen Gewebsintegration von PPE ist jedoch bisher weitgehend unbekannt.

## **5. Fragestellung**

Auf Grundlage der dargestellten Zusammenhänge soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden, welche Bedeutung die Hauptbestandteile des fibrinolytischen Systems (uPA, tPA, PAI-1) sowie das Glykoprotein VN für die Biointegration von Implantaten aus PPE besitzen.

## II. Material und Methoden

### 1. Vorbemerkung

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden im Zeitraum von 11/2010 bis 11/2015 in den Einrichtungen des Instituts für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die entsprechenden Tierversuche wurden unter Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-115-10 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Die Versuchsdurchführung und –auswertung erfolgten verblindet, erst nach Abschluss der Auswertung wurden die Versuchsnummern wieder den entsprechenden Versuchsgruppen zugeordnet.

### 2. Versuchstiere

Zur Durchführung der *In-vivo*-Versuche kamen weibliche Mäuse unterschiedlicher Zuchtlinien als Versuchstiere zum Einsatz. Die Mäuse wurden mit einem Körpergewicht von etwa 25-30g im Alter von etwa 8-16 Wochen für die Experimente eingesetzt. Bis zum Experiment wurden die Tiere in der hauseigenen Tierhaltung bei einer Umgebungstemperatur von 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Während der eigentlichen Versuchsphase für die *In-vivo*-Experimente wurden die Mäuse in Einzelkäfigen untergebracht. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Standard-Tierfutter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser. Auf die strikte Einhaltung eines 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus sowie die Vermeidung von Stressfaktoren wurde geachtet.

Zur Analyse der Bedeutung von uPA für die Biointegration von PPE kamen uPA-defiziente Mäuse (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6J-Hintergrund durch The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA; und zur Verfügung gestellt von Sandip

Kanse, seinerzeit Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland) zum Einsatz.

Zur Analyse der Bedeutung von tPA für die Biointegration von PPE wurden tPA-defiziente Mäuse (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6J-Hintergrund durch The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) untersucht.

PAI-1-defiziente Mäuse (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6J-Hintergrund durch The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) wurden zur Analyse der Bedeutung von PAI-1 für die Biointegration von PPE eingesetzt.

Die Bedeutung von VN für die Biointegration von PPE wurde anhand von VN-defizienten Mäusen (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6J-Hintergrund durch The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) analysiert.

Als Kontrollgruppen sowie zur Analyse der Auswirkungen einer funktionellen Oberflächenbeschichtung von PPE mittels uPA, tPA, PAI-1, VN sowie DFP-uPA und NE-tPA kamen Mäuse vom Wildtyp (WT) C57BL/6J (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) zum Einsatz.

### **3. Narkose**

Vor Durchführung aller operativen Eingriffe wurden die Versuchstiere durch eine Injektionsnarkose mittels Ketamin/Xylazin (Ketavet 100mg/ml, Pfizer, NY, USA sowie Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Dazu wurde zunächst eine Kurznarkose mittels Isoflouran (5,0 Vol.%; Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N<sub>2</sub>O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 in einer Begasungskammer eingeleitet. Im Anschluss wurde die eigentliche Narkose durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (100mg/kg Körpergewicht (KG)) und Xylazin, (10mg/kg KG) und Kochsalzlösung im Verhältnis 2,5:0,5:7 eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch regelmäßige intraperitoneale Injektion von Ketamin (100mg/kg KG) und Kochsalzlösung im Verhältnis 3:7. Über den

gesamten Narkosezeitraum wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere durch die Lagerung auf einer geeigneten Wärmeplatte konstant gehalten. Zudem erfolgte eine Versorgung der Augen zum Schutz vor Austrocknung mittels Dexpanthenol-haltiger Nasen- und Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland).

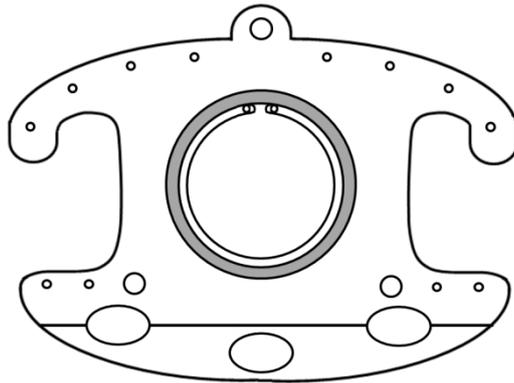
#### **4. Modell der transparenten Rückenhautkammer**

Das gut in der internationalen Fachliteratur etablierte Modell der transparenten Rückenhautkammer bietet eine exzellente Möglichkeit zur repetitiven fluoreszenzgestützten Darstellung von Vorgängen der Gefäßneubildung und Gewebsintegration von Biomaterialien sowie der leukozytären Rekrutierung im neu gebildeten Gefäßnetzwerk in einem chronischen *In-vivo*-Versuch. Das Design der Beobachtungskammer sowie die Durchführung der chirurgischen Präparation erfolgte in der durch Lehr [122] beschriebenen Modifikation zur Erstbeschreibung durch Algire [123]. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer ist für den Einsatz bei zahlreichen Labornagetieren beschrieben [124][125].

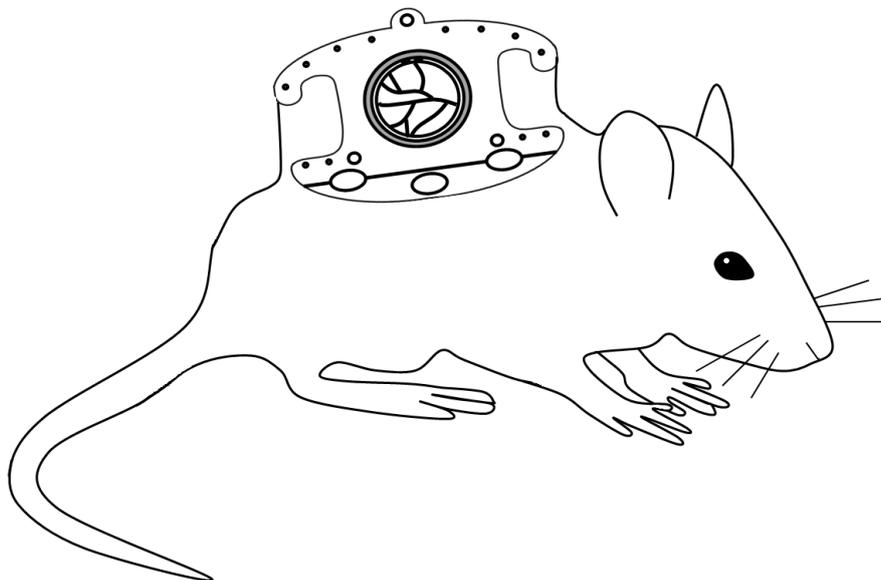
##### **4.1. Kammerdesign**

Die Beobachtungskammer besteht aus zwei spiegelsymmetrischen Titanplättchen, die mit drei Bohrungen zur Fixierung mittels dreier Fixierungsschrauben sowie zusätzliche Bohrungen zur Fixierung mittels Nähten versehen sind. Der untere Bereich ist zur Anpassung an die anatomischen Gegebenheiten am Mause Rücken gewinkelt gefertigt. Im zentralen Kammerbereich ist eine zirkuläre, 12 mm im Durchmesser messende Beobachtungsöffnung angebracht, welche durch einen mit der Kammer verpressten Titanring den Verschluss der Beobachtungsöffnung mittels Deckgläschen und Sprengring erlaubt. Zusätzliche Aussparungen zur Gewichtsersparung sind im inferioren Kammerbereich angebracht. Die Fixierungsschrauben werden mittels Muttern an der rückwärtigen Kammerhälfte befestigt und die zirkuläre Beobachtungsöffnung der vorderen Kammerhälfte mittels Deckglas (Durchmesser 11,8 mm, Stärke 1 mm, Hecht

Assistent, Sondheim, Deutschland) verschlossen. Die Distanz beider Kammerhälften wird mittels Distanzhülsen auf einen Abstand von 4mm fixiert, um eine Gewebstraumatisierung der zwischen den Kammerhälften zu liegenden Haut zu vermeiden. Das Gesamtgewicht der einsatzfertigen Kammer beträgt etwa 5 g (vergleiche Abbildung 4 und 5).



**Abbildung 4:** Konstruktionsskizze der Rückenhautkammer für Mäuse (angelehnt an [126]).



**Abbildung 5:** Maßstabgerechte schematische Darstellung einer Maus mit Rückenhautkammer.

## 4.2. Chirurgische Technik

Zur mikrochirurgischen Präparation der transparenten Rückenhautkammer wurde zunächst nach wie oben beschriebener Anästhesie die Rückenhaut der Maus im Operationsgebiet durch

Rasur und Behandlung mit Enthaarungscreme (elca®med, Asid Bonz, Deutschland) von Fell befreit. Anschließend wurde die Rückenhaut mittels 72%iger Ethanollösung (Cutasept®, Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert und das Versuchstier auf einer steril abgedeckten Wärmeplatte gelagert. Alle folgenden Operationsschritte erfolgten unter streng sterilen Bedingungen. Zuerst erfolgte unter Diaphanoskopie die Markierung der Gefäßversorgung der dorsalen Rückenhaut über die *Arteriae costales*, welche in der folgenden Präparation geschont wurden. Sodann wurde die Rückenhaut im Operationsgebiet mittels zweier Haltenähte (Ethibond Excel 5-0, Ethicon, USA) im kranialen und kaudalen Bereich aufgespannt. Im Anschluss erfolgte die Implantation der Rückseite der Rückenhautkammer an der dem Operateur abgewandten Seite der aufgespannten dorsalen Rückenhautfalte. Hierzu wurde die Haut an der Lokalisation der beiden inferioren Fixierungsschrauben mittels einer 14 G Nadel (Abbocath-T 14 G, Hospira, München, Deutschland) allschichtig perforiert und die beiden Fixierungsschrauben durch beide aufgefalteten Seiten der Rückenhaut geführt. Daraufhin erfolgte die Fixierung der Kammer im Bereich des superioren Hautrandes an den entsprechenden Fixierungslöchern am oberen Kammerrand mittels Hautnähten in Einzelknopftechnik (Ethibond Excel 5-0, Ethicon, USA). Anschließend wurde, ebenfalls unter Diaphanoskopie, das zu entfernende Hautareal im Bereich des zirkulären Beobachtungsfensters angezeichnet. Danach wurde das Versuchstier umgelagert, so dass das Operationsgebiet horizontal vor dem Operateur zu liegen kommt. Unter 14facher Vergrößerung mittels Operationsmikroskop (Wild M650, Wild AG, Herbrugg, Schweiz) erfolgte die allschichtige Entfernung der dem Operateur zugewandten Seite der aufgefalteten Rückenhaut sowie die mikrochirurgische Darstellung des *Musculus cutaneus maximus* der Gegenseite. Während des gesamten Operationsverlaufs wurde auf eine ständige Benetzung des Gewebes mit steriler isotonischer Kochsalzlösung geachtet. Im Anschluss wurde die Beobachtungskammer durch Fixierung der gegenseitigen Kammerhälfte an der oberen sowie den beiden unteren Fixierungsschrauben verschlossen. Dabei wurde auf eine vollständige Bedeckung des freiliegenden Rückenmuskels durch das Deckgläschen sowie eine komplette Adhärenz des Gewebes am Deckgläschen geachtet. Abschließend erfolgte eine erneute

Kontrolle der Präparation auf Gewebstraumatisierungen und Blutungen unter dem Operationsmikroskop.

Die Versuchstiere wurden bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose gewärmt und regelmäßig kontrolliert. Die Haut im Bereich des Operationsgebietes wurde zum Schutz vor Austrocknung und Gewebsschädigung mittels Dexpathenol-haltiger Nasen- und Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) versorgt.

Vor Implantation des PPE-Implantates erfolgte eine erneute Kontrolle der Kammerpräparation unter dem Operationsmikroskop. Ausschließlich Tiere mit Kammerpräparationen ohne lokale Infektzeichen, Einblutungen oder sonstige Gewebstraumatisierungen wurden in den Versuch eingeschlossen. Zur Implantation des PPE-Implantates erfolgte bei den Versuchstieren unter wie oben beschriebener Narkose und unter streng sterilen Bedingungen die Entfernung des das Beobachtungsareal bedeckenden Deckgläschens. Sodann wurde das Implantat in das Gewebe des gegenseitigen Rückenmuskels eingebracht. Anschließend wurde die Beobachtungskammer durch ein neues steriles Deckgläschen verschlossen. Dabei wurde auf eine vollständige Adhärenz des Wundareals am Deckgläschen geachtet.

Die Versuchstiere wurden über den gesamten Verlauf des Experiments regelmäßig hinsichtlich ihres allgemeinen körperlichen Gesamtzustandes sowie der Unversehrtheit der Kammerpräparation untersucht. Tiere, bei denen die Beobachtungskammern im weiteren Versuchverlauf Zeichen einer Gewebstraumatisierung, Einblutung oder Infektion aufwiesen, wurden vom Experiment ausgeschlossen.

Die Tiere tolerierten die Beobachtungskammer über den gesamten Verlauf des Experiments sehr gut und zeigten keine Zeichen einer Beeinträchtigung des allgemeinen Wohlbefindens (d.h. gestörte Nahrungsaufnahme, gestörter Tag-Nacht-Rhythmus, Gewichtsverlust).

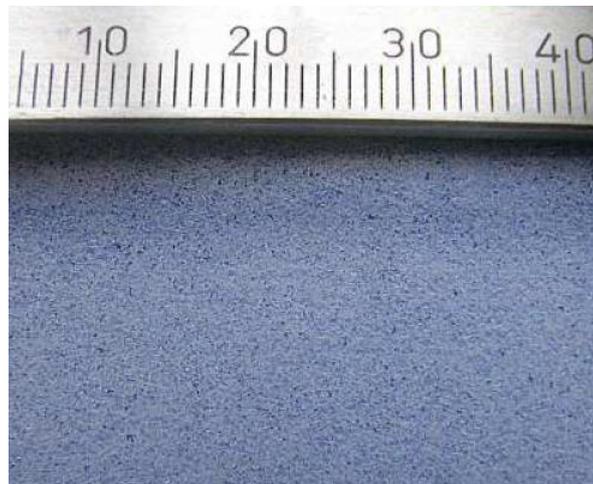
## **5. Schwanzvenenkatheter**

Die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen für die Intravitalmikroskopie erfolgte über die Katheterisierung der Schwanzvene. Hierzu wurde ein entsprechender Katheter aus einer 30 G

Kanüle (Sterican 30 G, B Braun, Melsungen, Deutschland) sowie einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28mm, Portex, Lythe, Großbritannien) gefertigt. Hiermit wurde nach Stauung die *Vena caudalis mediana* punktiert. Über den einliegenden Katheter konnten so dann während der intravitalmikroskopischen Untersuchung repetitiv Fluoreszenzfarbstoffe appliziert werden.

## 6. Implantate

Das verwendete Implantatmaterial (Medpor®, Stryker Corporation, Kalamazoo, MI, USA) ist gemäß dem Verwendungszweck in verschiedenen Formen und Größen kommerziell verfügbar. Zum Einsatz kamen vorgefertigte Implantatblätter der Stärke 0,25 mm, die auf eine Größe von 3x3 mm zugeschnitten wurden. Die Porengröße beträgt nach Herstellerangabe zwischen 100 und 250  $\mu\text{m}$  (vergleiche Abbildung 6). Nach Zuschnitt wurden die Implantate erneut einer Dampfsterilisation im gängigen Sterilisationsprogramm für Kunststoffe unterzogen (121 °C, 1bar, 40 min).



**Abbildung 6:** Poröses Polyethylen Sheet mit einer Porengröße von etwa 100 – 250  $\mu\text{m}$ .

Vor Implantation wurden die Implantate je nach Versuchsgruppe entweder in steriler physiologischer Kochsalzlösung gebadet oder einem Matrigel®-basierten Beschichtungsprotokoll unterzogen.

## 7. Implantatbeschichtung

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer bioaktiven Oberflächenbeschichtung des Implantatmaterials mit rekombinantem oder modifiziertem rekombinantem uPA, tPA, PAI-1 oder VN kam ein Matrigel-basiertes Beschichtungsprotokoll unter Verwendung von wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel (GFR-BD Matrigel, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz.

Matrigel stellt einen Extrakt extrazellulärer Matrixkomponenten des *Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkomes* dar, der bei 4°C in flüssiger Form vorliegt, bei Körpertemperatur jedoch zu einem festen Gel polymerisiert. Dementsprechend wurden die sterilen Implantate in einer sterilen Petrischale unter konsequenter Kühlung in 50µl GFR-Matrigel eingebettet und im Anschluss für 60 Minuten auf 37°C erwärmt, um eine vollständige Polymerisation der Matrixkomponenten zu erreichen.

Zuvor wurde das GFR-Matrigel, je nach Versuchsgruppe, mit den zu untersuchenden Proteinen angereichert. Dabei kam jeweils 1µg rekombinantes murines uPA, Diisopropylfluorophosphat (DFP)-uPA, tPA, non-enzymatic-tPA, PAI-1 oder 5µg VN (Sino Biological, Peking, China sowie Molecular Innovations, Novi, MI, USA) zum Einsatz. Diese Dosis hatte in Vorversuchen der Arbeitsgruppe signifikante Auswirkungen auf die Leukozytenrekrutierung im *Musculus-cremaster*-Assay der Maus gezeigt [102, 103].

## 8. Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Auflicht-Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss AxioTech Vario, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland) mit Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 103 W2, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei Trockenobjektive in den Vergrößerungen x4, x10, sowie x20 (Plan-Neofluar®, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland). Über einen Reflektorschieber mit Filterset 09 (Exzitation 450-490nm, Emission 514nm) und Filterset 14 (Exzitation 510-560nm,

Emission 590nm) (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland) konnten die Filtersätze für die entsprechenden Fluoreszenzmarker angewählt werden, zudem konnte zur Orientierung eine konventionelle Durchlicht-Mikroskopie durchgeführt werden. Das Versuchstier konnte auf einem manuell steuerbaren, skalierten Objektisch (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) in x-y-Richtung bewegt werden. Somit war das repetitive Aufsuchen der untersuchten *regions of interest* (ROI) möglich. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden über eine SIT-Video-kamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) sowie einen Videozeitgenerator (VGT 33, FOR-A-Company Ltd., Tokio, Japan) mittels eines digitalen Videorekorders (Sony DVCAM DSV 45P, Sony, Köln) zur anschließenden Offline-Analyse aufgezeichnet.

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der mikrovaskulären Parameter wurden die wachen Versuchstiere zunächst in einer Polyethylenröhre fixiert und auf eine spezialangefertigte Mikroskopierbühne (beides Effenberger, München, Deutschland) verbracht, welche die Lagerung der Tiere unter dem Fluoreszenzmikroskop erlaubte. Sodann wurden die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe über einen einliegenden Schwanzvenenkatheter appliziert. Gegebenenfalls war bei Verblässen der Marker während der Untersuchung jederzeit eine erneute Applikation möglich.

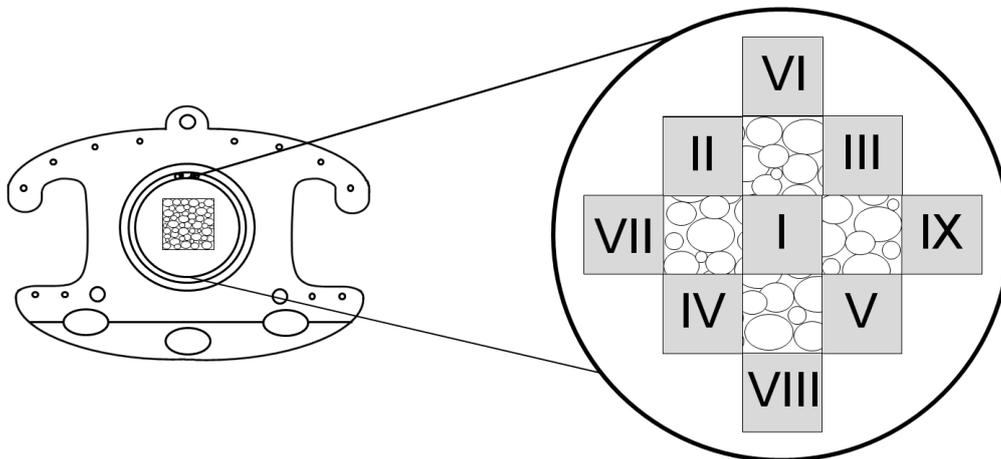
Zur Visualisierung des Gefäßnetzwerkes im Implantat sowie im umliegenden Gewebe kam FITC-markiertes hochmolekulares Dextran (500 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zum Einsatz. Hiermit kann aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Dextrans das Blutplasma dargestellt werden, eine Extravasation findet aufgrund der hohen Molekülgröße nicht statt. Somit können Parameter der Hämodynamik und der mikrovaskulären Architektur bestimmt werden. Das Exzitationsmaximum des Fluoreszenzmarkers beträgt 490nm, das Emissionsmaximum liegt dabei bei 520nm. Der Marker wurde in einer Konzentration von 5% in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, pro Untersuchung wurden am Versuchstier etwa 0,07ml appliziert.

Leukozyten-Endothelzellinteraktionen wurden unter Verwendung von Rhodamin 6 G zur Leukozytenmarkierung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) visualisiert. Rhodamin 6 G wird nach intravasaler Applikation vor allem von den Mitochondrien von Leukozyten aufgenommen, und

markiert diese somit zuverlässig. Eine deutlich geringere Aufnahme dieses Fluoreszenzmarkers war auch in Endothelzellen zu beobachten. Somit kann das Verhalten leukozytärer Zellen im Bereich der Blutbahn analysiert werden. Das Exzitationsmaximum von Rhodamin 6 G liegt bei 525nm, das Emissionsmaximum bei 555nm. Hier wurde der Marker in einer Konzentration von 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und pro Untersuchung ebenfalls etwa 0,07ml appliziert.

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden jeweils 9 ROIs ausgewählt, anhand der Koordinaten markiert und zu Folgeuntersuchungen wiederum aufgesucht. Dabei wurde je 1 ROI im Zentrum des Implantates, 4 ROIs in der Peripherie des Implantates sowie 4 ROIs unmittelbar das Implantat umgebenden Gewebe gewählt (vergleiche Abbildung 7).

Die Aufnahmezeit pro ROI betrug je Filtersatz 30 Sekunden, zwischen den Aufnahmezeitpunkten wurde streng darauf geachtet, die Lichtexposition des Untersuchungsareals zu vermeiden, um mögliche fototoxische Effekte auszuschließen.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Auswahl der intravitalmikroskopisch untersuchten ROIs, ROI I-V decken den Implantatbereich ab, wohingegen sich ROI VI – IX im Implantatlager befinden.

## 9. Analyse der Intravitalmikroskopischen Untersuchungen

Die aufgezeichneten Videodaten aus den intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden offline computerassistent ausgewertet.

Zunächst wurden die mikrovaskulären Parameter sowie die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen mit Hilfe der Anwendung *CapImage* (Zeintl, Heidelberg, Deutschland [127]) analysiert. Hierzu wurde der digitale Videorekorder mittels einer Bildverarbeitungskarte sowie einer RS-232-Schnittstelle mit dem Auswertecomputer verbunden. Nach Eichung über eine durch das Mikroskopsystem aufgenommenen 10 µm Skala konnten die entsprechenden Messungen erfolgen.

Zur Analyse der mittleren Gefäßdurchmesser wurden je ROI 20 Gefäßdurchmesser ermittelt und hierbei der Mittelwert gebildet.

Die Beurteilung der Flussgeschwindigkeit erfolgte nach der *line-shift-diagram* Technik [127]. Hierbei werden Grauwerte entlang einer axial zur Gefäßachse verlaufenden Linie bei laufender Videosequenz aufgezeichnet und in einem Zeit-Ort Diagramm dargestellt. Die Grauwertveränderungen werden durch den Fluss der Erythrozyten entlang der Gefäßachse bedingt. Die Steigung der im Diagramm entstehenden Linien ist dabei direkt proportional zur Flussgeschwindigkeit im Gefäß. Nach dieser Methode wurde die Flussgeschwindigkeit in 5 Gefäßen pro ROI ermittelt und hierbei ein Mittelwert gebildet.

Zur Auswertung der Gefäßdichte wurde das Gefäßnetzwerk im entsprechenden ROI nachgezeichnet und somit der Quotient von Gefäßstrecke zu Fläche gebildet. Hierbei wurden zur Analyse der funktionellen Gefäßdichte nur Gefäße mit in der Videoaufzeichnung sichtbarem Erythrozytenfluss ausgewertet, zur absoluten Gefäßdichte wurden auch nicht perfundierte, aber fluoreszierend kontrastierte Gefäßareale gewertet.

Die Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen erfolgte nach folgenden Maßgaben: Als der Gefäßwand fest adhärent wurden Zellen gewertet, welche sich über einen Zeitraum von 30 Sekunden stabil an der Gefäßwand anliegend darstellten. Hierbei wurde je analysiertem

Gefäß die Zellzahl pro 100 µm Gefäßwandlänge bestimmt. Als rollende Leukozyten wurden Zellen gewertet, welche eine orthogonal zur Gefäßachse verlaufende Linie mit einer Geschwindigkeit von weniger als 50% der Blutflussgeschwindigkeit im jeweiligen Gefäßsegment passierten. Hierbei wurde jeweils die Zellzahl in einer Zeit von 30 Sekunden bestimmt. Die Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen erfolgte in 5 Gefäßen je ROI, hierbei wurde wiederum ein Mittelwert gebildet.

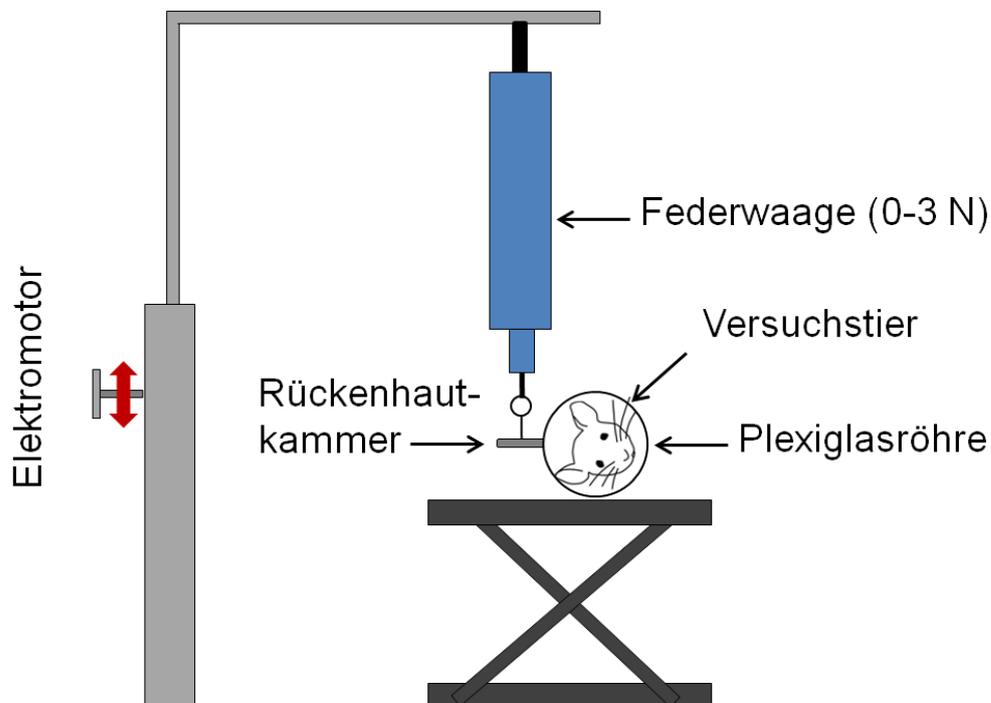
Zur genaueren Analyse der Gefäßarchitektur wurde im Anschluss eine Auswertung mit dem ImageJ Plugin *Analyze Skeleton* durchgeführt (Image J, NIH, USA) [128]). Hierzu wurde zunächst der digitale Videorekorder über einen firewire® Anschluss mit dem Auswertecomputer verbunden und Standbilder der auszuwertenden Videosequenzen erzeugt. Die Eichung erfolgte wie oben beschrieben über eine durch das Mikroskopsystem aufgenommene 10 µm Skala. Sodann wurde das entsprechende Gefäßnetzwerk nachgezeichnet und mit den ImageJ Plugins *Skeletonize* sowie *Analyze Skeleton* bearbeitet. Diese Analyse stellt nun detaillierte Architekturparameter des entsprechenden Gefäßnetzwerkes dar. Die Zielparameter hierbei waren Anzahl und Ordnung der Verzweigungspunkte, Dichte der Verzweigungspunkte sowie mittlere Länge der Gefäßsegmente. Verzweigungspunkte höherer Ordnung wurden je nach Anzahl der beteiligten Gefäße als doppelte, dreifache oder vierfache Verzweigungspunkte klassifiziert.

## **10. Messung der Gesamtleukozytenzahl**

Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Versuche wurden die Versuchstiere wie oben beschrieben anästhesiert, durch eine *Vena-cava*-Punktion eine Blutprobe gewonnen und mittels Coulter Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ein mechanisches Differentialblutbild erstellt.

## 11. Messung der strukturellen Gewebsintegration

Als valider Parameter für die funktionelle Gewebsintegration des Implantates wurde nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Messungen die nötige Kraft für die Luxation des Implantates aus dem Implantatbett ermittelt. Hierfür wurde nach Euthanasie des Versuchstieres das Deckglas der Rückenhautkammer geöffnet. Sodann wurde ein Loch am superioren Ende des Implantates mittels einer Kanüle (Sterican 30 G, B Braun, Melsungen, Deutschland) vorgestanzt und das Implantat unter 25-facher Vergrößerung mit einem Haltefaden (Ethilon 9-0, Ethicon, USA) fixiert. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass es zu keiner Bewegung des Implantates im Implantatbett kam. Nun wurde das Versuchstier in der oben beschriebenen Mikroskopierbühne in einer spezialangefertigten Vorrichtung (ICF, München, Deutschland) fixiert, welche unter konstanter Zugentwicklung über einen Elektromotor die Bestimmung der maximalen Bruchkraft bis zur vollständigen Luxation des Implantates aus dem Implantatbett ermöglicht. Die maximale Bruchkraft wurde hierbei über eine digitale Federwaage (Sauter FK 10, Sauter, Balingen, Deutschland) bestimmt (vergleiche Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues zur Messung der funktionellen Gewebsintegration.

Nach Beendigung des Versuches wurden Implantate sowie umgebendes Gewebe für weiterführende Untersuchungen in 4%-iger Formalinlösung fixiert oder bei -80°C kryokonserviert.

## **12. Konfokalmikroskopie**

Zur konfokalmikroskopischen Untersuchung wurden die Implantate zunächst in einer 4%-igen Formalinlösung fixiert und im Anschluss für 24 Stunden mit 0,02% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland) permeabilisiert und in 1%-iger BSA Lösung (in PBS) geblockt. Im Anschluss daran wurden die Proben nach dreimaligem Waschen in PBS für 72 Stunden mit den Primärantikörpern sowie nach erneutem dreimaligem Waschen für weitere 72 Stunden mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Der gesamte Färbungsprozess fand unter einer konstanten Umgebungstemperatur von 4°C statt. Die Primärantikörper richteten sich gegen die jeweiligen Zielproteine uPA, tPA, PAI-1, VN sowie CD31 (Santa Cruz, Dallas, TX) und wurden mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern markiert (Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG, Alexa Fluor 680 goat anti-rat IgG, Alexa Fluor 488 chicken anti-rat IgG, Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Proben in PermaFluor (Fisher Scientific, MA, USA) auf einem Objektträger mit Deckgläschen (Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) fixiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Leica SP8 SMD Mikroskop sowie einem Leica SP5 Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, es kamen jeweils Öl-Immersion Objektive (63x/NA1,2 sowie 40x/NA1,25-0,75, Leica, Wetzlar, Deutschland) zum Einsatz.

Zur semiquantitativen Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration im Implantatmaterial wurde die mittlere Fluoreszenzintensität in 3 ROIs je Probe in Bereichen innerhalb der Implantatporen bestimmt und auf das jeweilige Hintergrundsignal normalisiert.

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden zum Teil im Rahmen einer Kooperation mit der AG Prof. Zahler (Institut für Pharmazie, LMU München, Deutschland) erstellt.

### 13. Zwei-Photonen-Mikroskopie

Zur Analyse der Kollagendeposition im Implantatmaterial wurde das *second harmonic generation* Signal in der Multi-Photonen-Mikroskopie ausgenutzt. Dabei wurden ebenfalls in 4% Formalin fixierte Implantate auf einem Objektträger mit Deckglas fixiert und mit Hilfe eines Multi-Photonen- Mikroskops (TriM Scope, La Vision BioTec, Bielefeld, Deutschland) unter Verwendung eines 20x Ölimmersionsobjektives (XLUMPlanFI 20x/0,95 W, Olympus, Tokio, Japan) sowie eines 624/40nm Filters dargestellt. Die Exzitationswellenlänge betrug bei einer Laser-Intensität von 20mW 1275nm. 3 ROIs mit einer Abmessung von 500x500x100 µm wurden je Implantat mit einer Schichtdicke von 4 µm aufgenommen sowie in ImageJ weiter verarbeitet.

Zur Auswertung wurde das mittlere Fluoreszenzsignal in 3 ROIs je Implantat innerhalb der Poren des Implantates gemittelt und in Bezug auf die Fluoreszenzintensität des umgebenen Hintergrundsignals gesetzt.

### 14. Migration Assay

Die Chemotaxis-Versuche wurden in spezialisierten Chemotaxiskammern (Ibidi, Martinsried, Deutschland) bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> an einem Inversmikroskop (Eclipse Ti, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Die Experimente erstreckten sich über einen Zeitraum von 20 Stunden, die Messintervalle betragen hierbei 10 Minuten.

Zur Versuchsdurchführung wurden kommerziell erhältliche humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) (Promocell, Heidelberg, Deutschland) in Kulturmedium (ECGM, Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum gehalten und nach Erreichen eines konfluierenden Zellrasens mittels Trypsin gelöst. Anschließend wurden die Zellen in einer Lösung aus 30% Matrigel (Corning, Amsterdam, Niederlande) in Zellkulturmedium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Deutschland) eingebettet und bei einer Konzentration von 3x10<sup>6</sup> Zellen/ml in die Chemotaxiskammern eingebracht. Dabei kam ECGM, angereichert mit 30ng/ml rekombinan-

tem humanen tPA, 20ng/ml humanem rekombinatem uPA oder 1µg/ml rekombinatem humanen PAI-1 (Sino Biological, Peking, China) sowie ECGM ohne Zusatz zum Einsatz. Je Versuchsgruppe wurden 3 unabhängige Versuchsdurchgänge durchgeführt.

Die Analyse wurde mittels des ImageJ Plugins *Manual Tracking* sowie des *Chemotaxis and Migration Tool* (Ibidi, München, Deutschland) für jeweils 30 Zellen pro Experiment durchgeführt. Die Ergebnisdarstellung erfolgte über Ermittlung des Forward-Migration-Index (FMI II) als Parameter für die gerichtete Zellmigration. Hierbei stellt der FMI II die Effektivität der gerichteten Migration parallel zum vorliegenden Gradienten des chemotaktischen Stimulus dar.

Die Chemotaxisversuche wurden im Rahmen einer Kooperation mit der AG Prof. Zahler (Institut für Pharmazie, LMU München, Deutschland) durchgeführt.

## **15. Statistik**

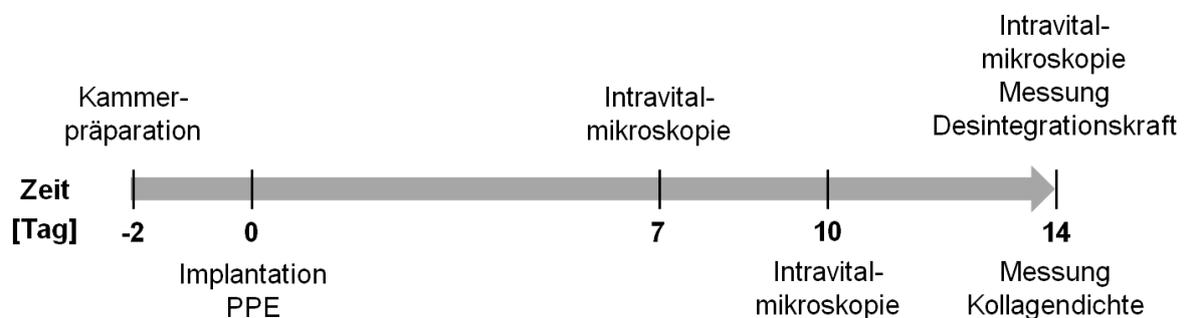
Alle Versuchsergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert (MW) +/- Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) angegeben. Alle statistischen Berechnungen wurden unter Einsatz der Anwendung *Sigma Stat TM* (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Zur Testung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde jeweils der *ANOVA-on-Ranks-Test*, gefolgt vom *Student-Newman-Keuls-Test* durchgeführt. Unterschiede von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

## **16. Versuchsprotokoll**

Allen Versuchen wurde zu Beginn eine Versuchsnummer zugeteilt. Während des gesamten Verlaufes des Experimentes sowie der gesamten Auswertung war eine Zuordnung zur Versuchsgruppe über die Versuchsnummer nicht möglich. Erst nach Abschluss der Auswertung wurde diese Verblindung wieder aufgehoben.

Initial wurde im Rahmen erster Vorversuche eine konfokalmikroskopische Untersuchung des Implantatmaterials nach oben beschriebenem Färbungsprotokoll durchgeführt. Hierbei wurde lediglich das PPE-Implantat zum gewünschten Zeitpunkt nach Implantation zur immunhistochemischen Untersuchung gewonnen, im Vorfeld waren keine intravitalmikroskopischen Messungen vorgenommen worden.

Alle weiteren Versuche folgten einem identischen Protokoll (vergleiche Abbildung 9). Die Gesamtdauer des Versuchs betrug hierbei 16 Tage.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.

Zunächst wurde, nach mikrochirurgischer Präparation der transparenten Rückenhautkammer und einer Erholungsphase von 2 Tagen, eine erneute mikroskopische Prüfung der Einschlusskriterien vorgenommen. Nur Versuchstiere mit intakter Kammerpräparation ohne Infektzeichen, Blutungen oder sonstige Irritationen im Bereich der Rückenhautkammer wurden in den Versuch aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Implantation des PPE-Implantates mit oder ohne Beschichtung wie zuvor beschrieben. Das erste intravitalmikroskopische Imaging mit Darstellung der mikrovaskulären Parameter sowie der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen fand am 7. Tag nach Implantation statt. Sodann folgten weitere intravitalmikroskopische Untersuchungen am 10. sowie 14. Tag *post implantationem*. Schließlich wurde am 14. Tag nach Abschluss aller intravitalmikroskopischen Messungen die Blutentnahme sowie Messung der

funktionellen Gewebsintegration des Implantates wie oben beschrieben vorgenommen. Zudem erfolgte die Asservierung von Proben aus dem Implantat und umgebenden Gewebe zur späteren weiteren Untersuchung.

### **III. Ergebnisse**

#### **1. Ergebnisse urokinase-type Plasminogen Activator, tissue Plasminogen Activator und Plasminogen Activator Inhibitor-1**

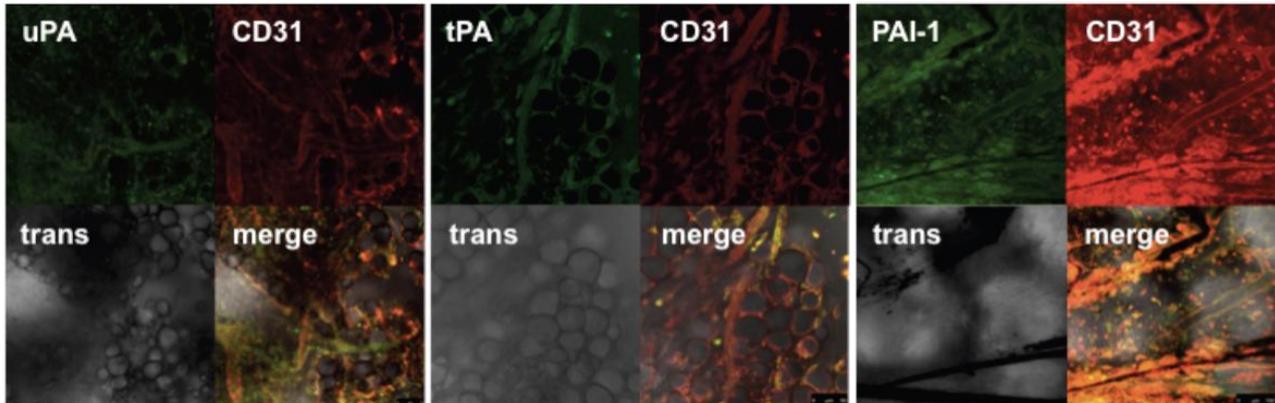
##### **1.1. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Biointegration von PPE- Implantaten**

###### **1.1.1. Verteilungsmuster von uPA, tPA und PAI-1 im PPE-Biomaterial 14 Tage nach Implantation**

In ersten Experimenten sollte zunächst die Verteilung wesentlicher Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems, genauer von uPA, tPA und PAI-1, im sich formierenden Gewebe innerhalb der Poren von frisch implantiertem PPE-Biomaterial untersucht werden.

Nach Implantation von PPE-Biomaterial kommt es aufgrund des chirurgischen Traumas zunächst zu einer moderaten Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. Leukozyten verlassen im Rahmen dieses Prozesses die Gefäßbahn und transmigrieren ins perivaskuläre Gewebe sowie in die Poren des Implantatmaterials. Hierbei werden zahlreiche Faktoren sezerniert, welche die Gewebsneubildung im Implantat induzieren. Aus vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass im Zeitraum von etwa 14 Tagen eine vollständige Vaskularisation sowie eine bindegewebige Integration des Implantatmaterials erreicht wird [94].

Dementsprechend wurden PPE-Implantate 14 Tage nach Implantation nach immunhistochemischer Färbung konfokalmikroskopisch untersucht. Dabei ließen sich die drei betrachteten Hauptkomponenten des fibrinolytischen Systems innerhalb der CD31-positiven Endothelzellen der Mikrogefäße sowie im perivaskulären Bereich des neu formierten Gefäßnetzwerkes nachweisen (vergleiche Abbildung 10).

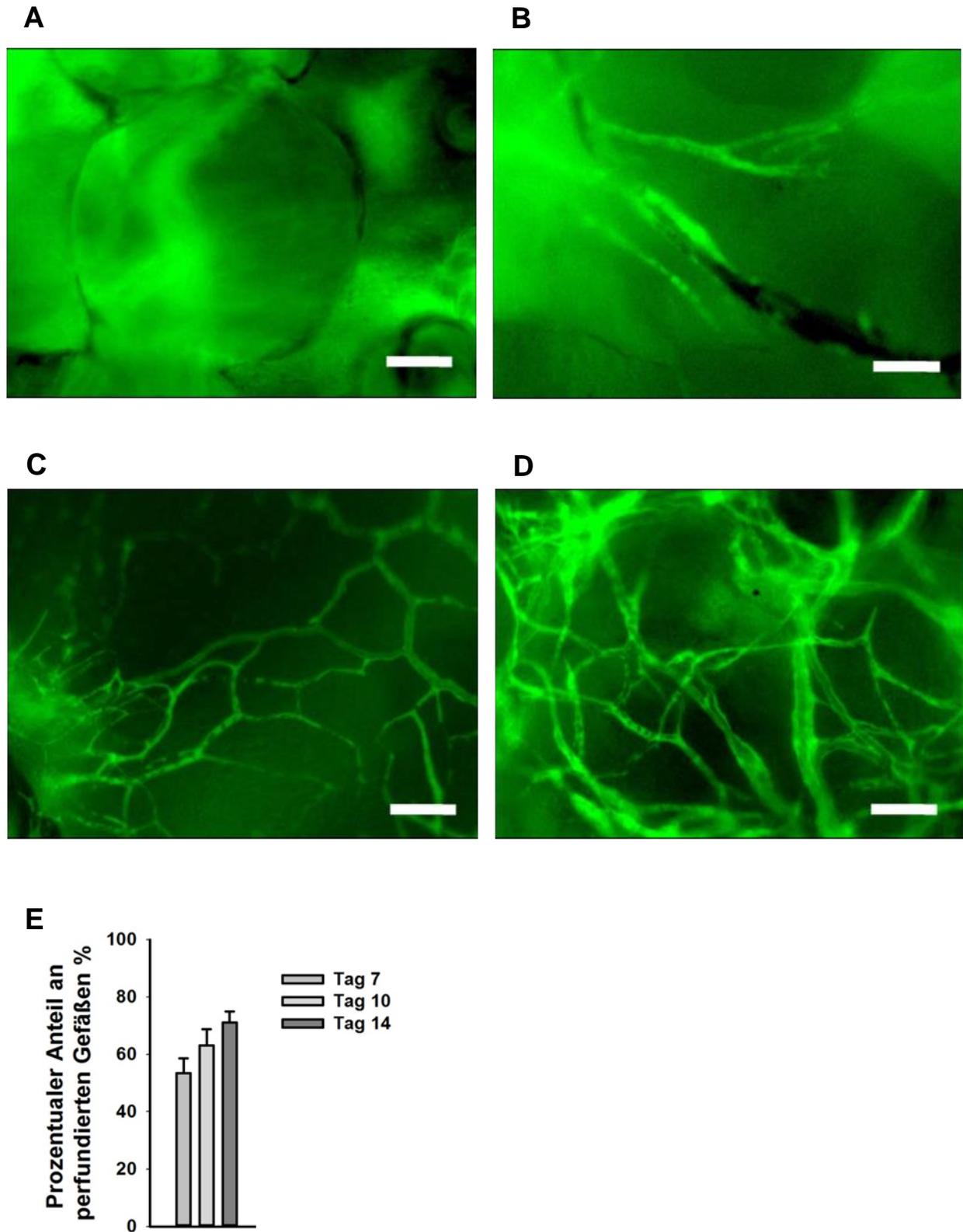


**Abbildung 10:** Konfokalmikroskopische Darstellung der Verteilung von uPA, tPA und PAI-1 in Relation zum CD31-positiven Gefäßnetzwerk im PPE-Implantat (Maßstabsbalken 100 µm, trans = Transilluminationsdarstellung, merge = Überlagerungsdarstellung).

### 1.1.2. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten

Nach diesen Vorversuchen sollten die einzelnen Schritte der Gewebsintegration von PPE in Abhängigkeit von den Komponenten des fibrinolytischen Systems näher herausgearbeitet werden.

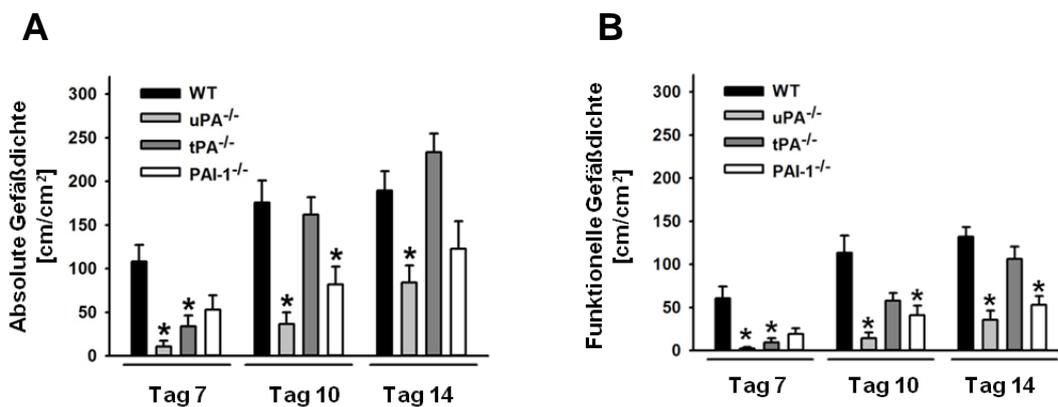
Zunächst sollte nun die Dynamik der Vaskularisation von PPE-Implantaten im WT-Tier dargestellt werden. Nach einem Versuchszeitraum von einer Woche ließen sich dabei erste Gefäßformationen im Implantat intravitalmikroskopisch erkennen. Hierbei zeigte sich ein Teil der neu gebildeten Gefäße bereits sichtbar von Blutplasma (gefärbt mittels FITC-Dextran) und Erythrozyten perfundiert, andere endotheliale *sprouts* fanden sich jedoch blind endend, nur mit Blutplasma gefüllt und ohne sichtbaren Fluss von Erythrozyten im Gefäß. 10 Tage nach Implantation ließ sich bereits eine deutliche Verdichtung des Gefäßnetzwerkes konstatieren, jedoch stellten sich nach wie vor nicht alle Anteile des Netzwerkes funktionell perfundiert dar. Nach 14 Tagen war schließlich eine nahezu vollständige Durchflechtung des Implantates mit einem funktionell perfundierten Gefäßnetzwerk festzustellen (vergleiche Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Zeitlicher Verlauf der Vaskularisation eines PPE-Implantates im WT-Versuchstier, repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen mittels FITC-Dextran als Plasmamarker, Tag 0 (A), Tag 7 (B), Tag 10 (C), Tag 14 (D), Prozentualer Anteil perfundierter Gefäße am Gesamtnetzwerk im PPE-Implantat im zeitlichen Verlauf im WT-Versuchstier (E) ( $MW \pm SEM$  für  $n=6$ , Maßstabsbalken  $100 \mu m$ ).

Im nächsten Schritt wurde nun die Vaskularisation von PPE-Implantaten in der transparenten Rückenhautkammer von uPA-, tPA- oder PAI-1-defizienten sowie WT-Kontrolltieren analysiert.

Hierbei zeigt sich die Vaskularisation des Implantatmaterials bei den genetisch veränderten Versuchstieren für alle drei Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems im Vergleich zum WT deutlich gestört (vergleiche Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation in uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren sowie WT-Tieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT-Kontrolle).

uPA-defiziente Tiere wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant verminderte absolute wie funktionelle Gefäßdichte im Implantatmaterial auf. Bei tPA-defizienten Versuchstieren zeigte sich ausschließlich eine signifikante Reduktion der absoluten und funktionellen Gefäßdichte zum ersten Untersuchungszeitpunkt 7 Tage nach Implantation; dies war zu späteren Versuchszeitpunkten nicht mehr feststellbar. Bei PAI-1-defizienten Tieren war wiederum erst in den späteren Phasen der vaskulären Integration eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte zu bemerken. Hierbei zeigte sich in Bezug auf die absolute Gefäßdichte eine signifikante Verminderung an Tag 10 nach Implantation, für die funktionelle Gefäßdichte eine signifikante Reduktion an Tag 10 und 14 nach Implantation.

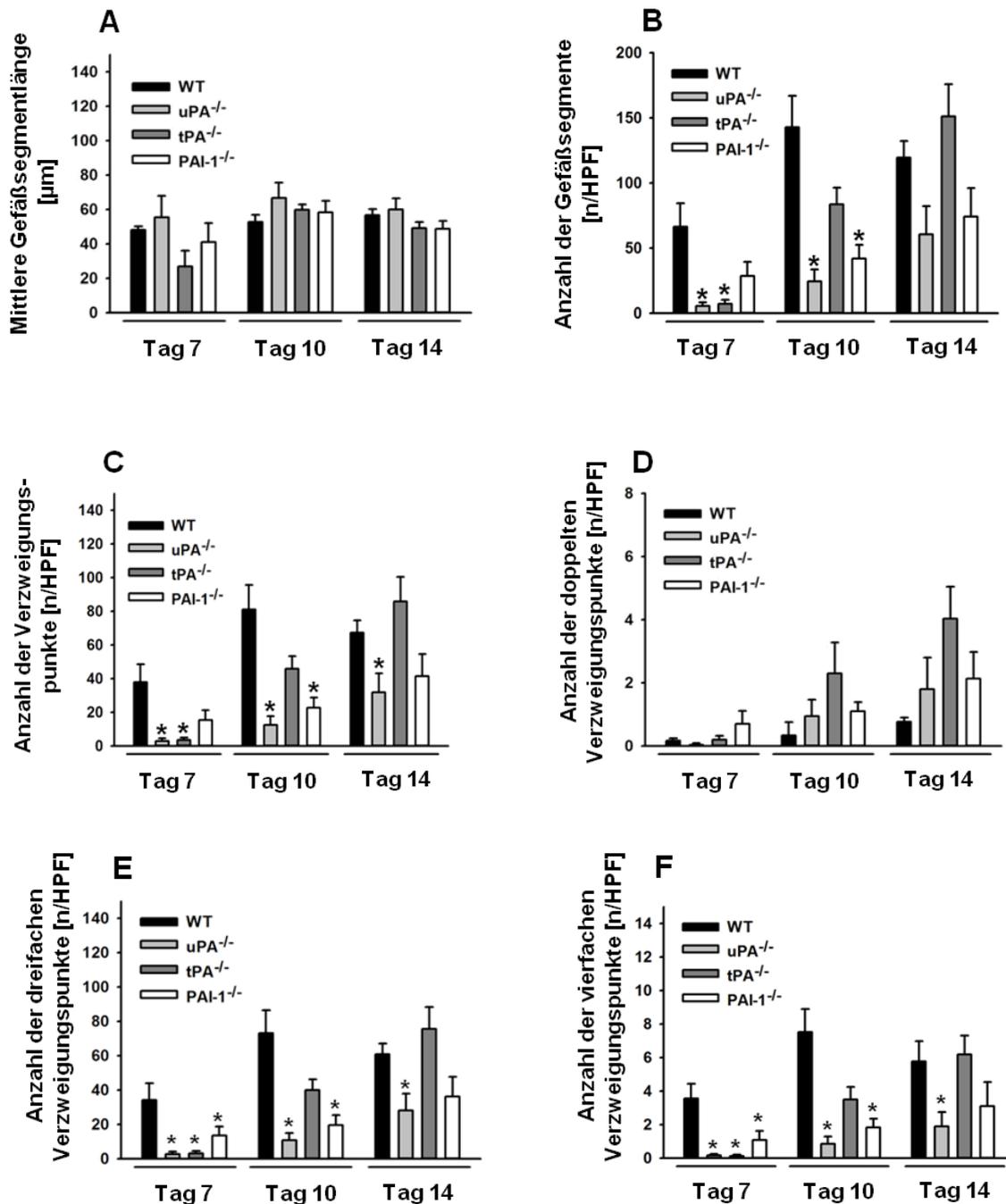
In Bezug auf mittlere Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeiten im neugebildeten Gefäßnetzwerk waren keine Veränderungen in den uPA-, tPA- oder PAI-1-defizienten Tieren zu bemerken (vergleiche Tabelle 2).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]</b>			
WT	17,0 $\pm$ 1,1	17,6 $\pm$ 0,7	16,3 $\pm$ 0,5
uPA <sup>-/-</sup>	16,5 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 1,4	15,6 $\pm$ 1,8
tPA <sup>-/-</sup>	15,1 $\pm$ 1,0	16,2 $\pm$ 0,7	14,8 $\pm$ 0,7
PAI-1 <sup>-/-</sup>	15,2 $\pm$ 1,3	15,8 $\pm$ 1,0	16,7 $\pm$ 1,3
<b>Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
WT	0,117 $\pm$ 0,019	0,155 $\pm$ 0,022	0,148 $\pm$ 0,009
uPA <sup>-/-</sup>	0,143 $\pm$ 0,011	0,114 $\pm$ 0,042	0,124 $\pm$ 0,018
tPA <sup>-/-</sup>	0,110 $\pm$ 0,030	0,132 $\pm$ 0,012	0,143 $\pm$ 0,017
PAI-1 <sup>-/-</sup>	0,123 $\pm$ 0,016	0,178 $\pm$ 0,032	0,131 $\pm$ 0,015

**Tabelle 2:** Mittlerer Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW $\pm$ SEM für n=6).

Im nächsten Schritt wurde eine genaue Analyse der Netzwerkarchitektur des sich bildenden Gefäßnetzwerkes im Implantatmaterial durchgeführt. Hierbei blieb die durchschnittliche Länge der Gefäßsegmente durch alle Versuchsgruppen sowie über den vollständigen Versuchszeitraum konstant. Jedoch zeigte sich bei uPA-defizienten Tieren über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikante Verminderung in Bezug auf Zahl der Gefäßäste, Zahl der Verzweigungspunkte und Zahl der Verzweigungspunkte höherer Ordnung (mit mehreren Gefäßabgängen) gegenüber der WT-Kontrollgruppe. Bei tPA-defizienten Tieren war auch hier, ähnlich wie bei der funktionellen Gefäßdichte, die signifikante Reduktion dieser Parameter auf die frühe Phase der Gewebsintegration beschränkt. PAI-1-defiziente Tiere zeigten, in Analogie zum De-

fizit in absoluter und funktioneller Gefäßdichte, eine signifikant verminderte Anzahl von Gefäßsegmenten und Verzweigungspunkten an Tag 10 nach Implantation. Verzweigungspunkte höherer Ordnung stellten sich an Tag 7 und 10 signifikant vermindert dar. Zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten war hier keine signifikante Reduktion feststellbar (vergleiche Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Mittlere Gefäßsegmentlänge (A), Anzahl der Gefäßsegmente (B) sowie Anzahl und Ordnung der Verzweigungspunkte (C-F) im Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT-Kontrolle).

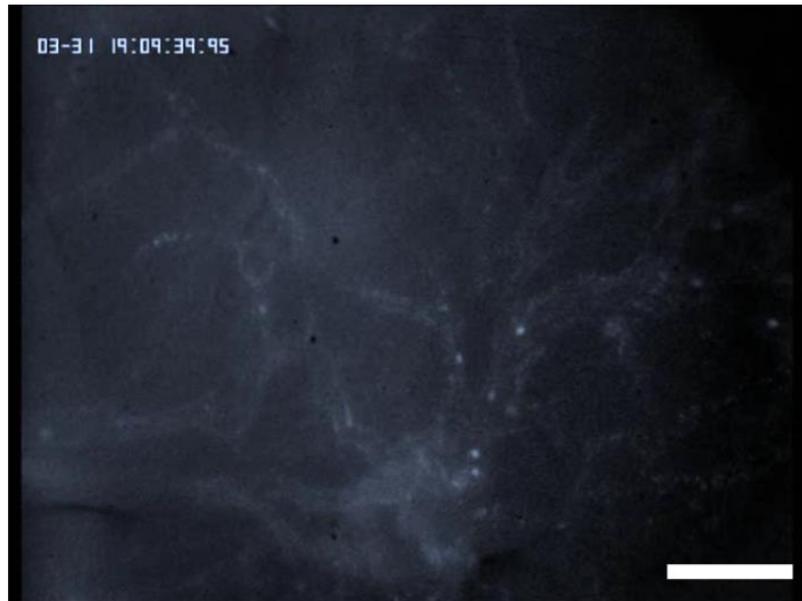
Im das Implantat umgebenden Gewebe waren keine Veränderungen in Bezug auf mikrovaskuläre Parameter zu bemerken (vergleiche Tabelle 3).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlere Gefäßdichte [cm/cm<sup>2</sup>]</b>			
WT	247,3±19,5	265,9±40,3	283,1±17,8
uPA <sup>-/-</sup>	250,6±15,3	255,2±16,3	253,9±19,4
tPA <sup>-/-</sup>	261,3±13,2	282,7±19,3	305,5±28,5
PAI-1 <sup>-/-</sup>	251,3±7,4	271,5±13,3	300,2±18,2
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [µm]</b>			
WT	20,3±0,5	20,5±1,2	19,6±1,0
uPA <sup>-/-</sup>	20,4±1,0	19,1±2,0	18,8±1,6
tPA <sup>-/-</sup>	17,9±1,3	18,1±0,9	17,2±1,0
PAI-1 <sup>-/-</sup>	21,6±1,1	18,4±2,3	17,8±2,2
<b>Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
WT	0,184±0,011	0,186±0,028	0,184±0,023
uPA <sup>-/-</sup>	0,221±0,090	0,160±0,024	0,163±0,039
tPA <sup>-/-</sup>	0,154±0,024	0,182±0,033	0,179±0,053
PAI-1 <sup>-/-</sup>	0,184±0,016	0,196±0,022	0,128±0,021

**Tabelle 3:** Mittlere Gefäßdichte, mittlerer Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit im umgebenden Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

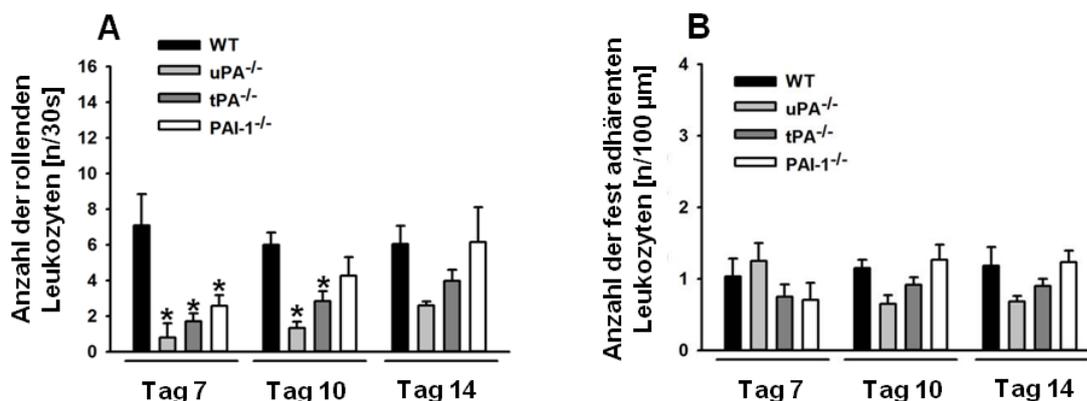
### 1.1.3. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten

Leukozytär vermittelte Mechanismen tragen zur funktionellen Biointegration von Biomaterialien bei. Dementsprechend wurden die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen in den Mikrogefäßen im Implantat und im umgebenden Implantatlager an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation intravitalmikroskopisch analysiert (vergleiche Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Darstellung der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im neu gebildeten Gefäßnetzwerk eines PPE-Implantates im WT-Versuchstier, repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen mittels Rhodamin 6G als Leukozytenmarker (Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ ).

Dabei zeigten sich die Zahl der im Implantat am Endothel der neu gebildeten Mikrogefäße rollenden Leukozyten in der frühen Integrationsphase in uPA-, tPA- und PAI-1-defizienten Tieren signifikant gegenüber den WT-Tieren reduziert. Jedoch ließ sich keine signifikante Veränderung der Zahl der am Endothel fest adhärenen Leukozyten feststellen (vergleiche Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Anzahl der am Gefäßendothel rollenden (A) sowie fest adhärenen Leukozyten (B) in neu gebildeten Mikrogefäßen im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW $\pm$ SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT-Kontrolle).

In den Mikrogefäßen im Implantatlager waren über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen bezüglich der Leukozytenrekrutierung zu verzeichnen (vergleiche Tabelle 4).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Anzahl der rollenden Leukozyten [n/30 sec]</b>			
WT	7,4±1,6	5,3±1,3	4,6±0,7
uPA <sup>-/-</sup>	7,3±1,9	5,1±0,8	4,2±0,5
tPA <sup>-/-</sup>	4,6±1,3	3,5±0,3	3,6±0,2
PAI-1 <sup>-/-</sup>	5,8±1,6	3,8±0,6	4,9±1,2
<b>Anzahl der fest adhärenen Leukozyten [n/100µm]</b>			
WT	1,5±0,2	1,2±0,4	1,2±0,1
uPA <sup>-/-</sup>	1,6±0,4	1,1±0,2	0,9±0,1
tPA <sup>-/-</sup>	1,5±0,4	1,1±0,2	0,9±0,1
PAI-1 <sup>-/-</sup>	1,2±0,1	1,1±0,1	0,9±0,2

**Tabelle 4:** Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

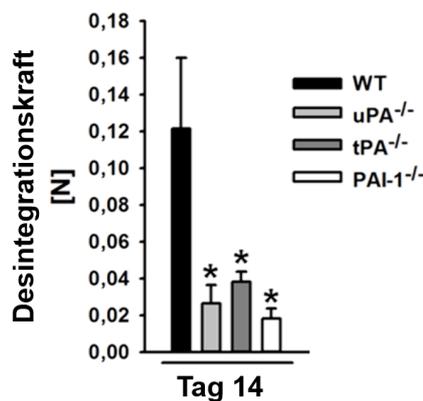
Die systemischen Leukozytenzahlen nach Versuchsende bewegten sich bei den uPA-, tPA- und PAI-1-defizienten Tieren auf zu den WT-Kontrolltieren vergleichbarem Niveau (vergleiche Tabelle 5).

	Tag 14
<b>Systemische Leukozytenzahl [x10<sup>3</sup>/µl]</b>	
WT	4,8±1,3
uPA <sup>-/-</sup>	8,9±2,2
tPA <sup>-/-</sup>	3,8±1,2
PAI-1 <sup>-/-</sup>	5,2±0,5

**Tabelle 5:** Systemische Leukozytenzahl bei Versuchsende bei WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

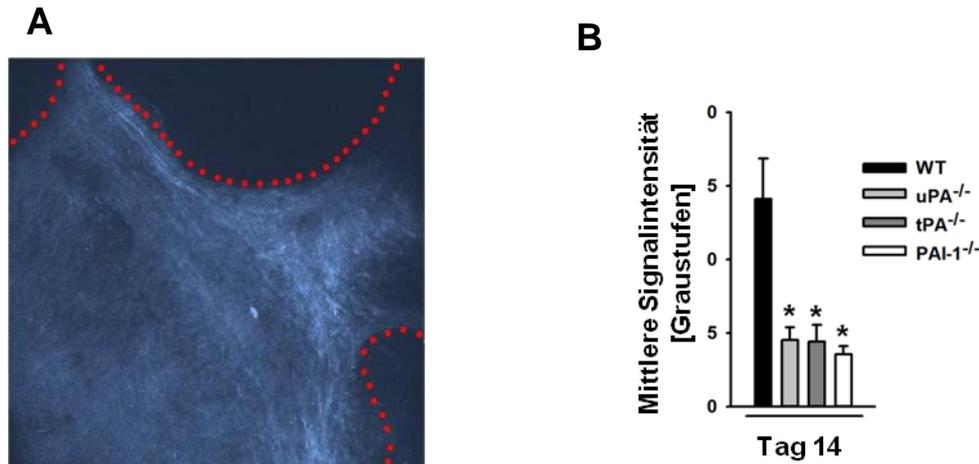
#### 1.1.4. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten

Zur Überprüfung der funktionellen Gewebsintegration des PPE-Implantates nach 14 Tagen wurde die zur Luxation des Implantates aus dem Implantatlager notwendige Desintegrationskraft bestimmt. Hierbei stellte sich der Kraftaufwand bei uPA, tPA oder PAI-1 defizienten Tieren gegenüber dem bei WT-Versuchstieren als signifikant reduziert dar (vergleiche Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation bei WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT-Kontrolle).

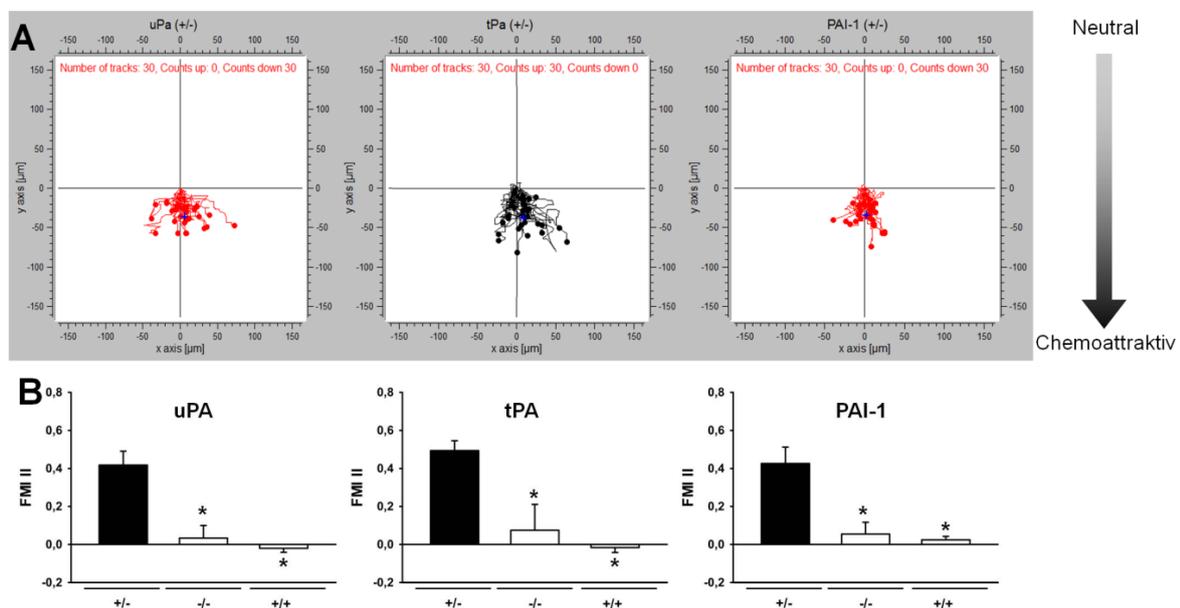
Die fibrovaskuläre Integration eines Biomaterials in sein Implantatlager wird über die Ausbildung einer bindegewebigen Vernetzung mit dem umgebenden Gewebe über Kollagenfibrillen vermittelt. Zur diesbezüglichen Analyse wurde die Kollagendeposition im Implantatmaterial mittels Multi-Photonen-Mikroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich die Kollagendeposition, dargestellt über die mittlere Intensität des *second harmonic generation* Signals in Implantaten bei uPA-, tPA- oder PAI-1-defizienten Tieren als signifikant gegenüber der WT-Kontrolle vermindert (vergleiche Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Kollagendeposition im Implantatmaterial im WT-Tier (A), repräsentative Multi-Photon-Mikroskopie-Aufnahme, (Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , rote Markierung: Poren des Implantates), Mittlere Signalintensität (B) an Tag 14 nach Implantation in uPA-, tPA- und PAI-1-defizienten Tieren sowie WT-Tieren (MW $\pm$ SEM für n=4, \*p<0,05 vs. WT-Kontrolle).

### 1.1.5. Chemotaktische Eigenschaften von uPA, tPA und PAI-1 auf migrierende Endothelzellen

Zur Analyse des Potentials von uPA, tPA und PAI-1 zur Rekrutierung endothelialer Zellpopulationen wurde deren Effekt auf den Forward-Migration-Index (FMI II) migrierender Endothelzellen untersucht (vergleiche Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Einfluss von rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf den FMI II migrierender Endothelzellen, gezeigt sind repräsentative Migrationsplots (A), sowie die kumulative Auswertung (MW $\pm$ SEM für n=3, \*p < 0,05 vs. +/-) (B), +/+ stellt hierbei die Positivkontrolle mit gleichmäßiger Konzentration des chemotaktischen Stimulus im Migrationsmedium dar, -/- steht für die Negativkontrolle ohne chemotaktischen Stimulus im Migrationsmedium, wohingegen +/- einen kontinuierlichen Gradienten des jeweiligen chemotaktischen Stimulus repräsentiert.

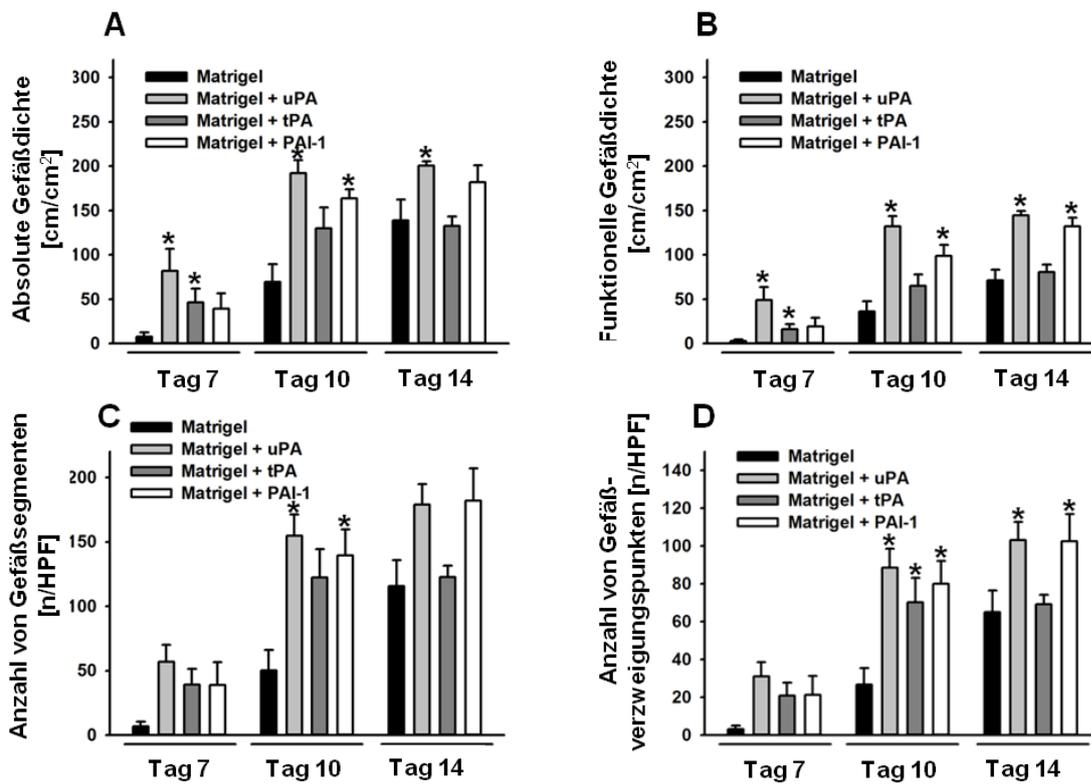
Dabei stellt der FMI II die Effektivität der Zellmigration parallel zu einem Chemokin-Gradienten dar. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verbesserung der gerichteten Migration von Endothelzellen unter Verwendung von uPA, tPA oder PAI-1 im Sinne eines chemotaktischen Stimulus.

## **1.2. Auswirkung einer bioaktiven Oberflächenbeschichtung von PPE mit rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1**

### **1.2.1. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 auf die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten**

Um diese neuen Erkenntnisse über die Bedeutung von uPA, tPA oder PAI-1 bei der funktionellen Gewebsintegration von Biomaterialien in einen klinisch relevanten Anwendungsbereich zu übertragen, wurden im WT-Tier Versuche mit einer Oberflächenbeschichtung der PPE-Implantate mit rekombinatem uPA, tPA und PAI-1 (eingebettet in GFR-Matrigel) durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten alleinig mit GFR-Matrigel beschichtete Implantate, die ebenfalls in Rückenhautkammern bei WT-Versuchstieren implantiert wurden.

Durch eine bioaktive Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 ließ sich eine signifikante Verbesserung der frühen vaskulären Integration des Implantatmaterials in das umgebende Implantatlager erzielen. Hierbei zeigte eine tPA-Oberflächenbeschichtung vor allem einen Einfluss auf die frühe Integrationsphase und verbesserte absolute und funktionelle Gefäßdichte an Tag 7 nach Implantation signifikant. Die Oberflächenbeschichtung mit PAI-1 hingegen erhöhte an Tag 10 und 14 nach Implantation die funktionelle, sowie an Tag 10 die absolute Gefäßdichte im Implantatmaterial. uPA als Oberflächenbeschichtung wirkte sich im gesamten Versuchszeitraum signifikant auf absolute und funktionelle Gefäßdichte im Implantatmaterial aus. Diese Effekte spiegeln sich auch im Hinblick auf Anzahl an Verzweigungspunkten und Gefäßästen im neu gebildeten Gefäßnetzwerk wieder (vergleiche Abbildung 19). Die durchschnittliche Länge der einzelnen Gefäßsegmente blieb wiederum im Vergleich unter den Gruppen konstant (vergleiche Tabelle 6).



**Abbildung 19:** Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte sowie Anzahl von Gefäßsegmenten (C) und Gefäßverzweigungspunkten (D) an Tag 7, 10 und 14 im Implantatmaterial nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 (MW $\pm$ SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel).

In Bezug auf mittlere Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeiten waren hierbei keine Auswirkungen einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem uPA, tPA und PAI-1 festzustellen (vergleiche Tabelle 6).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]</b>			
Matrigel	15,1 $\pm$ 0,7	17,1 $\pm$ 1,1	16,2 $\pm$ 0,3
Matrigel + uPA	16,5 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 0,8	16,0 $\pm$ 0,7
Matrigel + tPA	15,1 $\pm$ 0,7	16,1 $\pm$ 0,7	16,6 $\pm$ 0,6
Matrigel + PAI-1	15,9 $\pm$ 0,5	18,0 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 0,9
<b>Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
Matrigel	0,095 $\pm$ 0,004	0,158 $\pm$ 0,016	0,163 $\pm$ 0,037
Matrigel + uPA	0,140 $\pm$ 0,032	0,171 $\pm$ 0,019	0,150 $\pm$ 0,019
Matrigel + tPA	0,117 $\pm$ 0,022	0,166 $\pm$ 0,017	0,151 $\pm$ 0,020
Matrigel + PAI-1	0,129 $\pm$ 0,028	0,153 $\pm$ 0,014	0,140 $\pm$ 0,016
<b>Gefäßsegmentlänge [<math>\mu\text{m}</math>]</b>			
Matrigel	50,6 $\pm$ 5,6	69,2 $\pm$ 8,1	52,6 $\pm$ 4,9
Matrigel + uPA	64,8 $\pm$ 3,9	50,2 $\pm$ 2,8	47,9 $\pm$ 1,6
Matrigel + tPA	73,3 $\pm$ 8,6	53,9 $\pm$ 8,1	53,8 $\pm$ 3,7
Matrigel + PAI-1	69,3 $\pm$ 0,8	53,1 $\pm$ 3,1	49,5 $\pm$ 0,9

**Tabelle 6:** Mittlere Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit und Gefäßsegmentlängen im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + uPA, tPA oder PAI-1 (MW $\pm$ SEM für n=6).

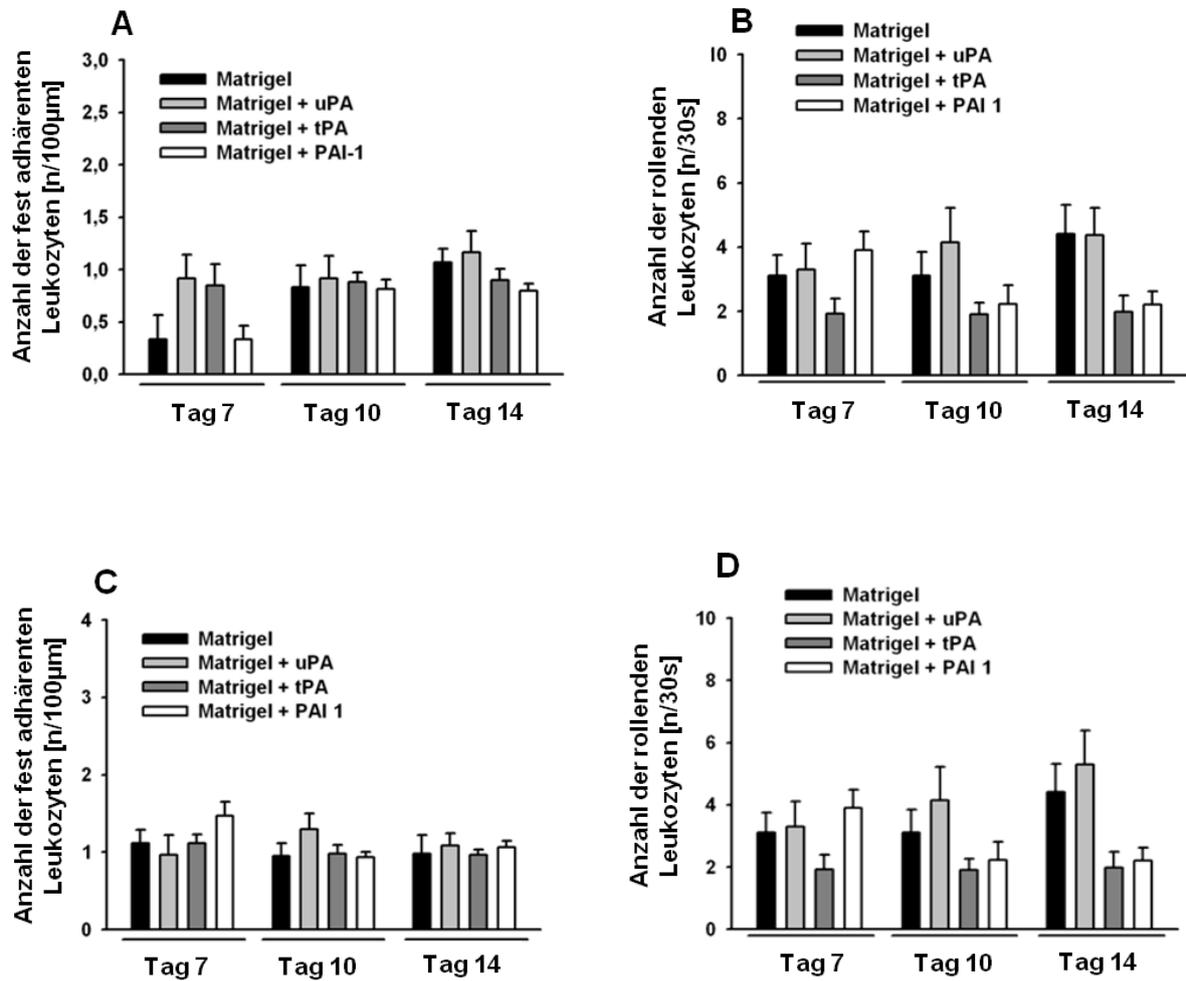
Die mikrovaskulären Parameter im umgebenden Implantatbett wiesen keine signifikanten Alterationen bei Verwendung einer Implantatbeschichtung mittels rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 auf (vergleiche Tabelle 7).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]</b>			
Matrigel	18,0 $\pm$ 0,8	17,9 $\pm$ 1,2	17,0 $\pm$ 0,8
Matrigel + uPA	17,9 $\pm$ 0,8	17,6 $\pm$ 0,8	17,1 $\pm$ 0,4
Matrigel + tPA	19,8 $\pm$ 0,9	18,9 $\pm$ 0,9	19,1 $\pm$ 0,6
Matrigel + PAI-1	18,4 $\pm$ 0,7	17,9 $\pm$ 0,6	17,5 $\pm$ 1,5
<b>Mittlere Gefäßdichte [<math>\text{cm}/\text{cm}^2</math>]</b>			
Matrigel	309,2 $\pm$ 18,3	305,1 $\pm$ 15,7	328,9 $\pm$ 17,4
Matrigel + uPA	294,1 $\pm$ 16,1	311,2 $\pm$ 14,2	311,2 $\pm$ 9,1
Matrigel + tPA	278,0 $\pm$ 16,1	302,6 $\pm$ 17,7	296,3 $\pm$ 10,0
Matrigel + PAI-1	288,3 $\pm$ 10,0	291,9 $\pm$ 15,2	319,1 $\pm$ 17,8
<b>Blutflussgeschwindigkeit [<math>\text{mm}/\text{s}</math>]</b>			
Matrigel	0,233 $\pm$ 0,031	0,196 $\pm$ 0,029	0,146 $\pm$ 0,006
Matrigel + uPA	0,199 $\pm$ 0,043	0,167 $\pm$ 0,017	0,130 $\pm$ 0,010
Matrigel + tPA	0,235 $\pm$ 0,006	0,212 $\pm$ 0,031	0,166 $\pm$ 0,018
Matrigel + PAI-1	0,219 $\pm$ 0,020	0,183 $\pm$ 0,027	0,133 $\pm$ 0,021

**Tabelle 7:** Mittlerer Gefäßdurchmesser, Gefäßdichte und Blutflussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + uPA, tPA oder PAI-1 ( $MW \pm SEM$  für  $n=6$ ).

### 1.2.2. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten

In Bezug auf die inflammatorische Reaktion nach Implantation von PPE-Biomaterial ließen sich sowohl im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantat, als auch im umgebenden Implantatlager keine Auswirkungen einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen feststellen (vergleiche Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Leukozytenrekrutierung im Implantatmaterial (A, B) sowie im Implantatlager (C, D) an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinanten uPA, tPA oder PAI-1 ( $MW \pm SEM$  für  $n=6$ ,  $*p < 0,05$  vs. Matrigel).

Die systemischen Leukozytenzahlen bei Versuchsende bewegten sich nach bioaktiver Oberflächenbeschichtung des Implantates mittels uPA, tPA oder PAI-1 auf zu den Kontrolltieren vergleichbarem Niveau (vergleiche Tabelle 8).

<b>Tag 14</b>	
<b>Systemische Leukozytenzahl [<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>]</b>	
Matrigel	4,2 $\pm$ 1,2
Matrigel + uPA	3,9 $\pm$ 1,0
Matrigel + tPA	4,5 $\pm$ 1,1
Matrigel + PAI-1	4,2 $\pm$ 1,1

**Tabelle 8:** Systemische Leukozytenzahl bei Versuchsende an Tag 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 (MW $\pm$ SEM für n=6).

### 1.2.3. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten

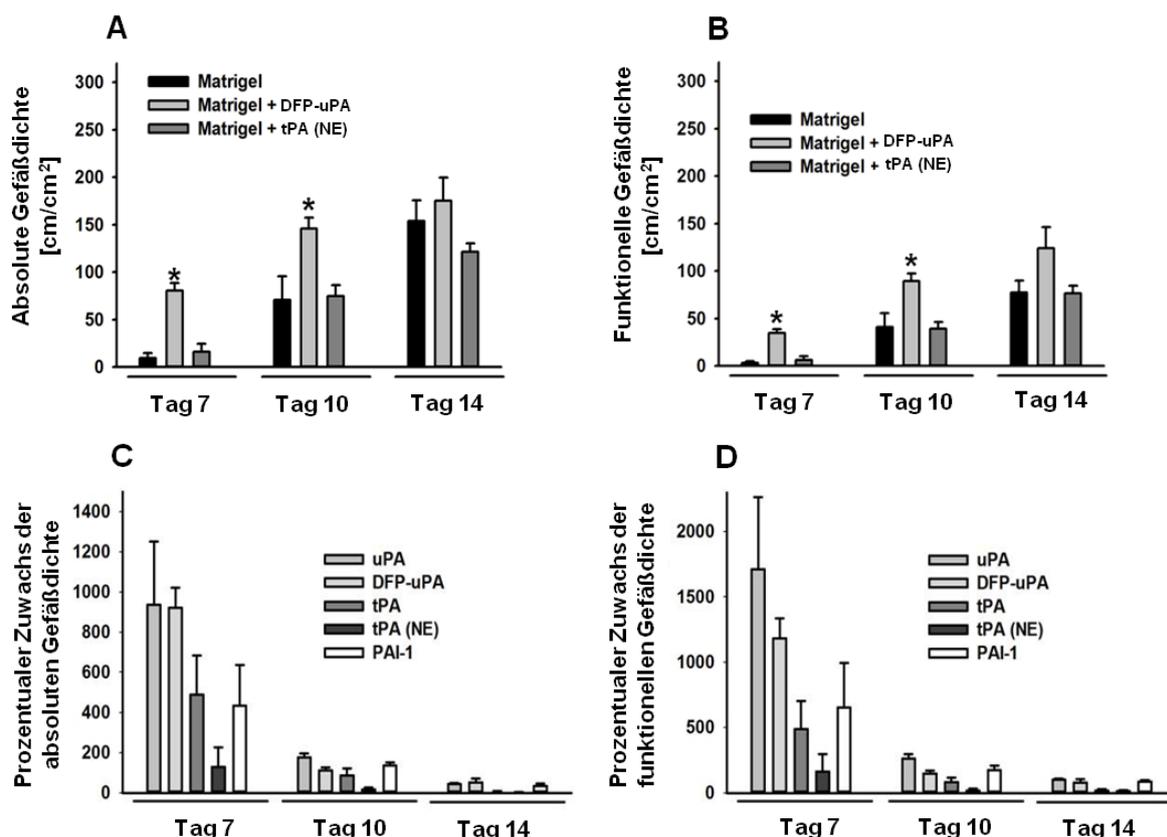
Die notwendige Kraft für die mechanische Desintegration des Implantates aus dem Implantatbett nach 14 Tagen wurde durch eine Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 nicht signifikant beeinflusst (vergleiche Tabelle 9).

<b>Tag 14</b>	
<b>Desintegrationskraft [N]</b>	
Matrigel	0,032 $\pm$ 0,007
Matrigel + uPA	0,050 $\pm$ 0,006
Matrigel + tPA	0,042 $\pm$ 0,010
Matrigel + PAI-1	0,050 $\pm$ 0,006

**Tabelle 9:** Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinatem uPA, tPA oder PAI-1 (MW $\pm$ SEM für n=6).

### 1.2.4. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA oder tPA ohne proteolytische Aktivität auf die Biointegration von PPE-Implantaten

Für die beiden proteolytisch aktiven Enzyme uPA und tPA ist bekannt, dass sie sowohl auf proteolytischem als auch auf nicht-proteolytischem Wege Effekte vermitteln. Um dies in Bezug auf den Einfluss der Proteine auf die vaskuläre Biointegration von PPE zu differenzieren, wurden Versuche mit rekombinantem tPA ohne proteolytische Aktivität (NE-tPA), sowie rekombinantem uPA, dessen Aktivität mittels Diisopropylfluorophosphat (DFP) inaktiviert wurde, durchgeführt. Hierbei zeigte DFP-uPA signifikante Auswirkungen auf die frühe Vaskularisation von PPE-Implantaten, die nahezu vergleichbar mit den Effekten von uPA waren, wohingegen NE-tPA die Vaskularisierung des Implantatmaterials nicht beeinflusste (vergleiche Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation von mittels DFP-uPA oder NE-tPA beschichteten PPE-Implantaten, prozentualer Zuwachs der absoluten (C) und funktionellen (D) Gefäßdichte bei Oberflächenbeschichtung mittels uPA, DFP-uPA, tPA, NE-tPA, sowie PAI-1 gegenüber eine alleinigen Beschichtung mit Matrigel an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation (MW $\pm$ SEM für n=5, \*p<0,05 vs Matrigel).

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich kein Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf die mittleren Gefäßdurchmesser und Flussgeschwindigkeiten, die Leukozytenrekrutierung in Implantat und Implantatlager sowie die mechanische Gewebeintegration des Implantates. Die systemischen Leukozytenzahlen 14 Tage nach Implantation wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (vergleiche Tabelle 10).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Implantatmaterial</b>			
<b>Anzahl der rollenden Leukozyten [n/30 sec]</b>			
Matrigel	2,2±0,6	2,0±0,6	3,3±0,3
Matrigel + DFP-uPA	2,1±0,4	1,9±0,2	2,7±0,5
Matrigel + tPA (NE)	1,5±0,1	1,6±0,2	2,8±0,4
<b>Anzahl der fest adhärenen Leukozyten [n/100µm]</b>			
Matrigel	0,7±0,3	0,8±0,2	1,1±0,1
Matrigel + DFP-uPA	1,0±0,2	0,9±0,3	0,8±0,1
Matrigel + tPA (NE)	0,6±0,1	0,9±0,2	1,0±0,1
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [µm]</b>			
Matrigel	15,1±0,7	17,1±1,1	16,2±0,3
Matrigel + DFP-uPA	17,8±0,5	18,4±0,4	18,1±0,7
Matrigel + tPA (NE)	16,0±0,8	17,3±0,6	18,1±0,7
<b>Mittlere Gefäßdichte [cm/cm<sup>2</sup>]</b>			
Matrigel	7,9±4,6	69,5±20,2	138,8±23,4
Matrigel + DFP-uPA	80,8±7,1	146,2±10,3	175,1±22,7
Matrigel + tPA (NE)	16,3±7,8	74,8±10,6	117,3±9,0
<b>Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
Matrigel	0,095±0,004	0,158±0,016	0,163±0,037
Matrigel + DFP-uPA	0,154±0,006	0,146±0,016	0,146±0,016
Matrigel + tPA (NE)	0,116±0,028	0,144±0,017	0,167±0,011

**Implantatlager****Anzahl der rollenden Leukozyten [n/30 sec]**

Matrigel	3,1±0,6	3,1±0,7	4,4±0,9
Matrigel +DFP-uPA	3,4±0,8	2,3±0,2	3,5±0,2
Matrigel + tPA (NE)	2,3±0,3	2,2±0,3	3,2±0,2

**Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten [n/100µm]**

Matrigel	1,1±0,2	1,0±0,2	1,0±0,2
Matrigel + DFP-uPA	0,8±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1
Matrigel + tPA (NE)	1,3±0,2	1,1±0,1	0,9±0,1

**Mittlerer Gefäßdurchmesser [µm]**

Matrigel	18,0±0,8	17,9±1,2	17,0±0,8
Matrigel + DFP-uPA	20,5±0,7	20,7±0,4	18,9±0,6
Matrigel + tPA (NE)	20,2±0,9	20,3±0,5	19,0±0,5

**Mittlere Gefäßdichte [cm/cm<sup>2</sup>]**

Matrigel	309,2±18,3	305,1±15,7	328,9±17,4
Matrigel +DFP-uPA	283,3±11,0	303,2±9,4	308,7±10,8
Matrigel + tPA (NE)	289,1±11,0	315,7±8,8	298,9±5,4

**Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]**

Matrigel	0,233±0,031	0,196±0,029	0,146±0,006
Matrigel +DFP-uPA	0,211±0,019	0,178±0,013	0,146±0,005
Matrigel + tPA (NE)	0,222±0,025	0,165±0,008	0,159±0,013

**Weitere Parameter****Systemische Leukozytenzahl [x10<sup>3</sup>/µl]**

Matrigel	4,2±1,2
Matrigel + DFP-uPA	4,1±1,2
Matrigel + tPA (NE)	4,2±1,1

**Desintegrationskraft [N]**

---

Matrigel	0,032±0,007
Matrigel + DFP-uPA	0,034±0,007
Matrigel + tPA (NE)	0,024±0,005

---

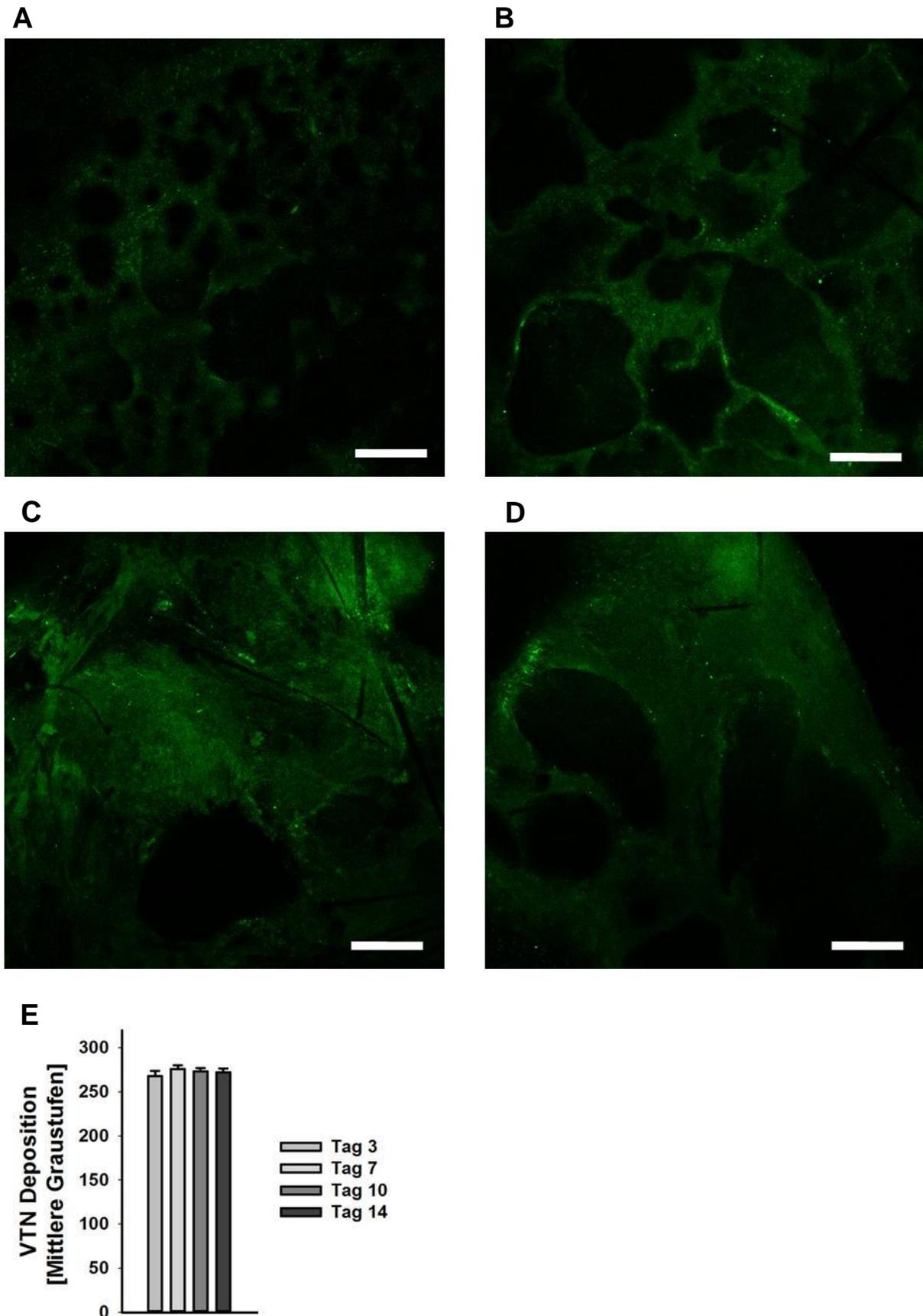
**Tabelle 10:** Mikrovaskuläre Parameter der Mikrozirkulation sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in Implantat und Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + DFP-uPA oder tPA (NE), systemische Leukozytenzahl und mechanische Gewebsintegration des Implantates an Tag 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + DFP-uPA oder tPA (NE) (MW±SEM für n=5).

## **2. Ergebnisse Vitronektin**

### **2.1. Bedeutung von endogenem VN für die Biointegration von PPE-Implantaten**

#### **2.1.1. Verteilungsmuster des matrizellulären Bindeproteins VN nach Implantation von PPE-Implantaten**

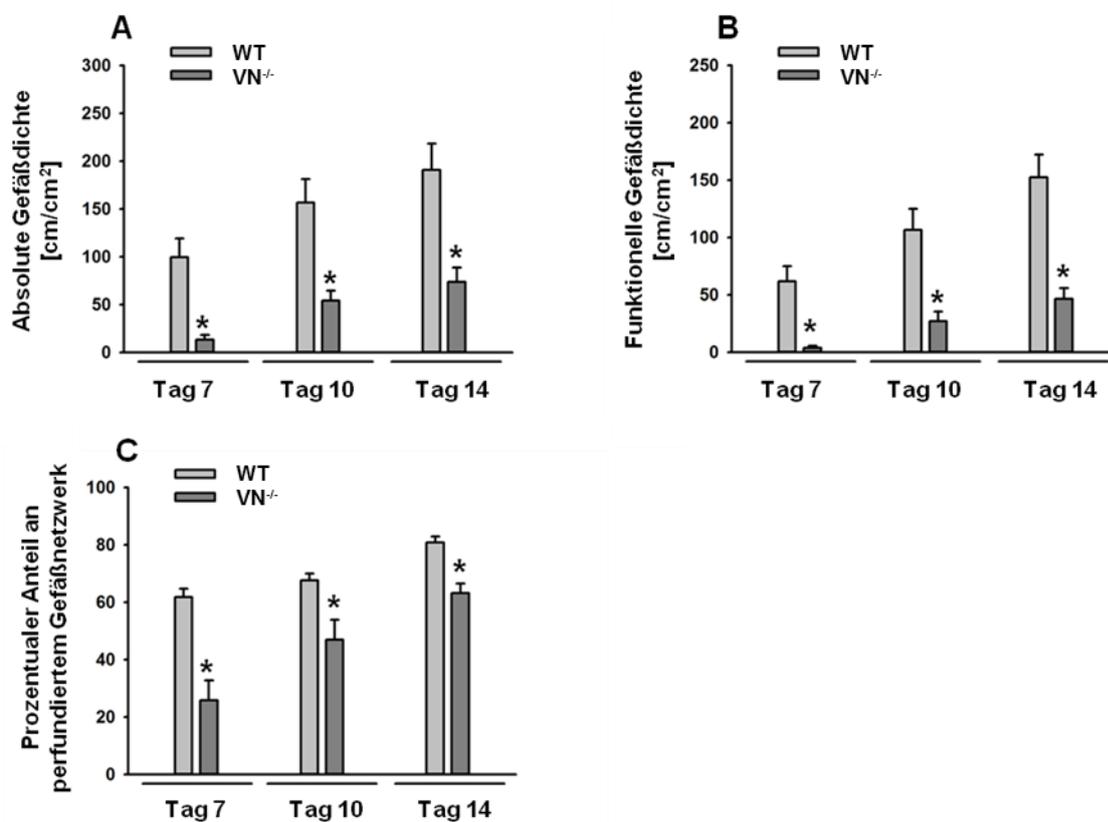
Nachdem VN nach Verletzungen und bei Entzündungsreaktionen in den extravasalen Raum austritt und im Bindegewebe abgelagert wird, wurde auch die Verteilung von VN im frisch implantierten Biomaterial mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Dabei zeigte sich, dass VN bereits kurz nach der Implantation in den Poren des PPE-Implantatmaterials aufgefunden werden kann und über den gesamten Untersuchungszeitraum auf konstantem Niveau nachzuweisen ist (vergleiche Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Repräsentative konfokalmikroskopische Darstellung der Deposition von VN im Implantatmaterial an Tag 3 (A), 7 (B), 10 (C) und 14 (D) nach Implantation, Mittlere Graustufenintensität an Tag 3, 7, 10 und 14 nach Implantation (E;  $MW \pm SEM$  für  $n=3$ , Maßstabsbalken 100  $\mu m$ ).

## 2.1.2. Bedeutung von endogenem VN für die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten

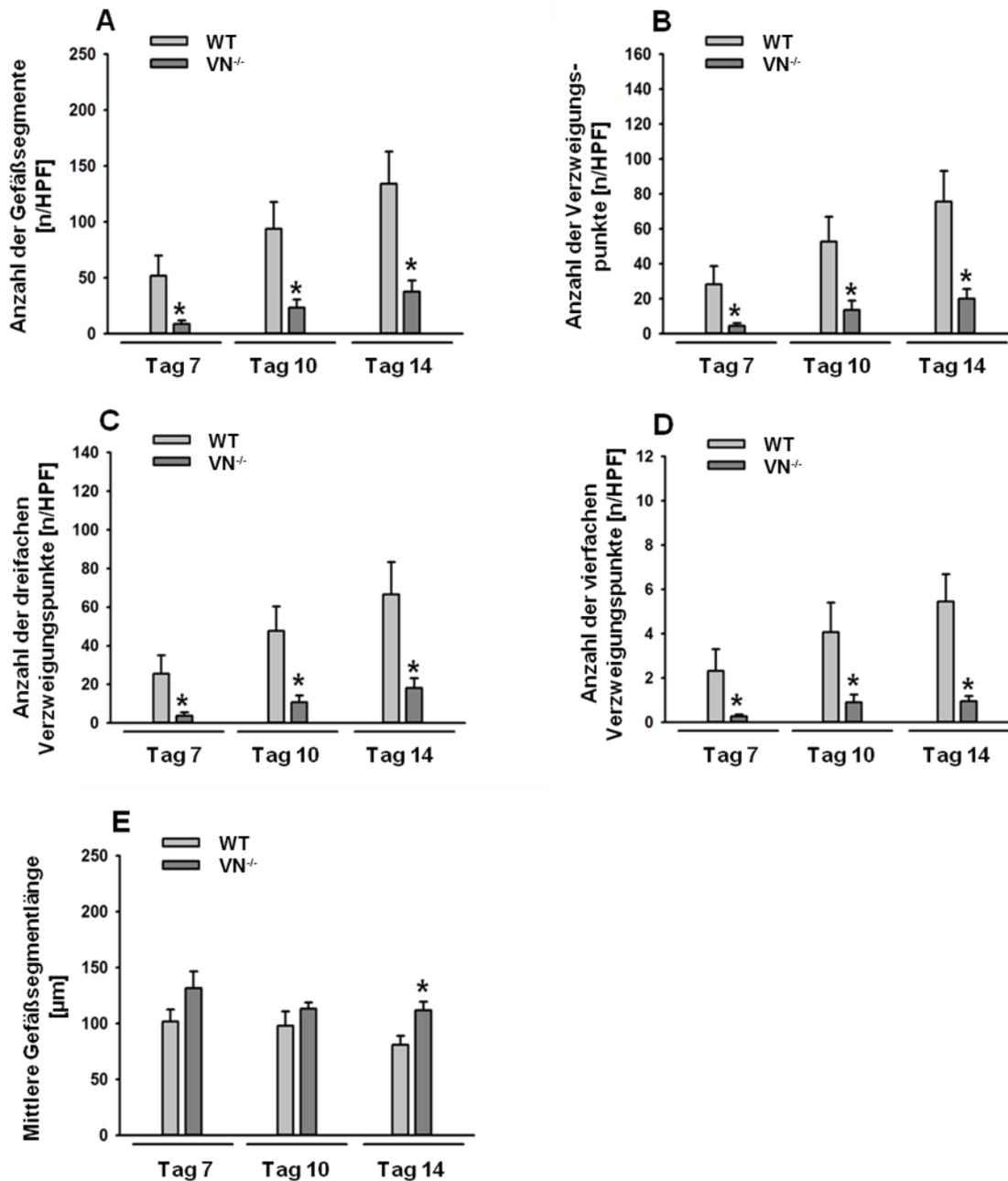
Bei VN-defizienten Tieren war über den gesamten Beobachtungszeitraum zu allen Messzeitpunkten eine signifikante Reduktion sowohl der absoluten als auch funktionellen Vaskularisation des Implantatmaterials festzustellen. Dementsprechend stellte sich ebenfalls der prozentuale Anteil des gesamten neu gebildeten Gefäßnetzwerkes, der zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bereits voll perfundiert ist, als signifikant vermindert dar (vergleiche Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates, prozentualer Anteil an perfundiertem Gefäßnetzwerk (C) in WT, sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT).

Dieser Effekt zeigte sich auch in der Analyse der Anzahl an Gefäßsegmenten, Gefäßverzweigungspunkten und Gefäßverzweigungspunkten höherer Ordnung im sich bildenden Gefäßnetzwerk. Die durchschnittliche Gefäßsegmentlänge war im Vergleich zu WT-Tieren zunächst

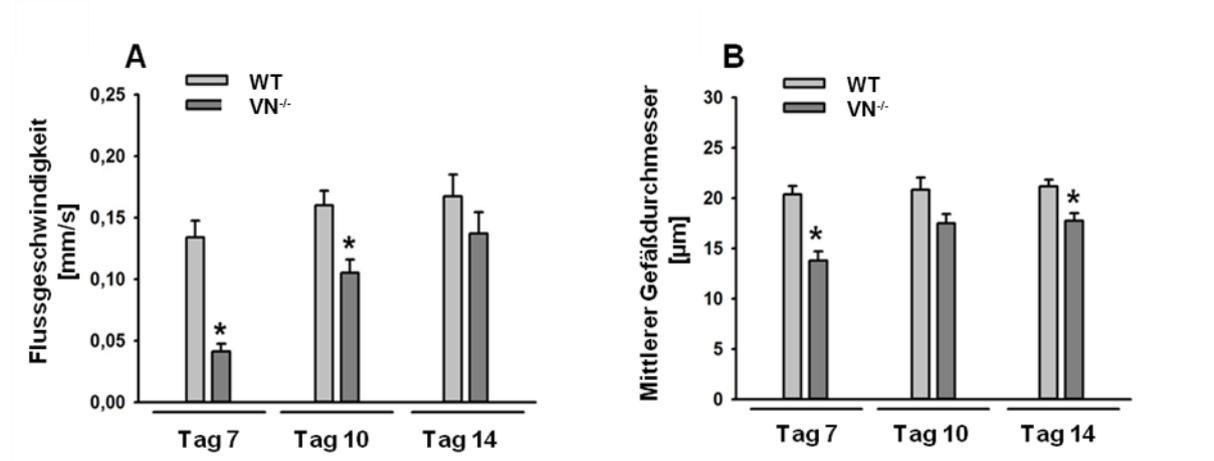
ähnlich, 14 Tage nach Implantation wiesen die VN-defizienten Versuchstiere jedoch eine signifikant größere mittlere Segmentlänge im Vergleich zu WT-Tieren auf (vergleiche Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Anzahl an Gefäßsegmenten (A) und Verzweigungspunkten (B-D) sowie durchschnittliche Segmentlänge im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial (E) an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT, sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT).

In der frühen Integrationsphase nach Implantation eines PPE-Implantates war zudem eine Reduktion der Flussgeschwindigkeiten im neu gebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial bei VN<sup>-/-</sup> Tieren auffällig. Am 14. Tag nach Implantation war dieser Effekt jedoch nicht mehr

nachzuweisen. Die mittleren Gefäßdurchmesser stellten sich dagegen interessanterweise an Tag 7 sowie 14 nach Implantation in VN-defizienten Tieren signifikant vermindert dar (vergleiche Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Flussgeschwindigkeit (A) und mittlerer Gefäßdurchmesser (B) im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. WT).

Im das Implantat umgebenden Implantatbett waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt Veränderungen der mikrovaskulären Parameter festzustellen (vergleiche Tabelle 11).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [µm]</b>			
WT	23,1±1,5	22,1±1,2	22,7±1,1
VN <sup>-/-</sup>	23,0±0,7	24,8±0,6	23,0±0,8
<b>Mittlere Gefäßdichte [cm/cm<sup>2</sup>]</b>			
WT	288,4±9,5	301,6±13,4	292,7±15,6
VN <sup>-/-</sup>	260,9±15,6	276,5±14,1	294,4±16,6
<b>Flussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
WT	0,188±0,007	0,200±0,019	0,200±0,017
VN <sup>-/-</sup>	0,166±0,014	0,200±0,019	0,200±0,009

**Tabelle 11:** Mittlere Gefäßdurchmesser, mittlere Gefäßdichte und Flussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

### 2.1.3. Bedeutung von endogenem VN für Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten

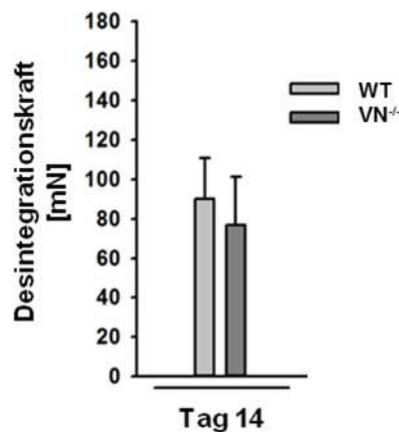
Auch in Bezug auf die leukozytäre Rekrutierung nach Implantation eines PPE-Biomaterials ließen sich sowohl im Implantat selbst, als auch im das Implantat umgebenden Implantatlager keine signifikanten Alterationen bei VN-defizienten Versuchstieren im Vergleich zur WT-Kontrolle feststellen (vergleiche Tabelle 12). Auch die systemischen Leukozytenzahlen 14 Tage nach Implantation wiesen keine signifikanten Differenzen auf (Daten nicht gezeigt).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Implantatmaterial</b>			
<b>Anzahl an rollenden Leukozyten [n/30s]</b>			
WT	2,5±1,0	2,3±0,9	2,2±0,7
VN <sup>-/-</sup>	1,5±0,5	1,3±0,2	1,7±0,3
<b>Anzahl an fest adhärenenten Leukozyten [n/100µm]</b>			
WT	1,1±0,2	1,0±0,1	0,5±0,2
VN <sup>-/-</sup>	0,6±0,1	0,5±0,1	1,0±0,2
<b>Implantatlager</b>			
<b>Anzahl an rollenden Leukozyten [n/30s]</b>			
WT	2,8±0,4	2,4±0,7	2,2±0,6
VN <sup>-/-</sup>	2,0±0,5	1,5±0,3	1,6±0,6
<b>Anzahl an fest adhärenenten Leukozyten [n/100µm]</b>			
WT	1,1±0,2	1,1±0,2	0,9±0,1
VN <sup>-/-</sup>	1,0±0,1	0,8±0,3	0,9±0,2

**Tabelle 12:** Anzahl an rollenden sowie fest adhärenenten Leukozyten im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantat sowie im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE Implantation in WT sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

### 2.1.4. Bedeutung von endogenem VN für die strukturelle Gewebsintegration von PPE-Implantaten

Die strukturelle Bindegewebsintegration, wiederum ermittelt über die für die Luxation des Implantates aus dem Implantatbett notwendige Kraft, stellte sich 14 Tage nach Implantation in VN-defizienten Versuchstieren nicht signifikant verändert gegenüber den WT-Kontrolltieren dar (vergleiche Abbildung 26).

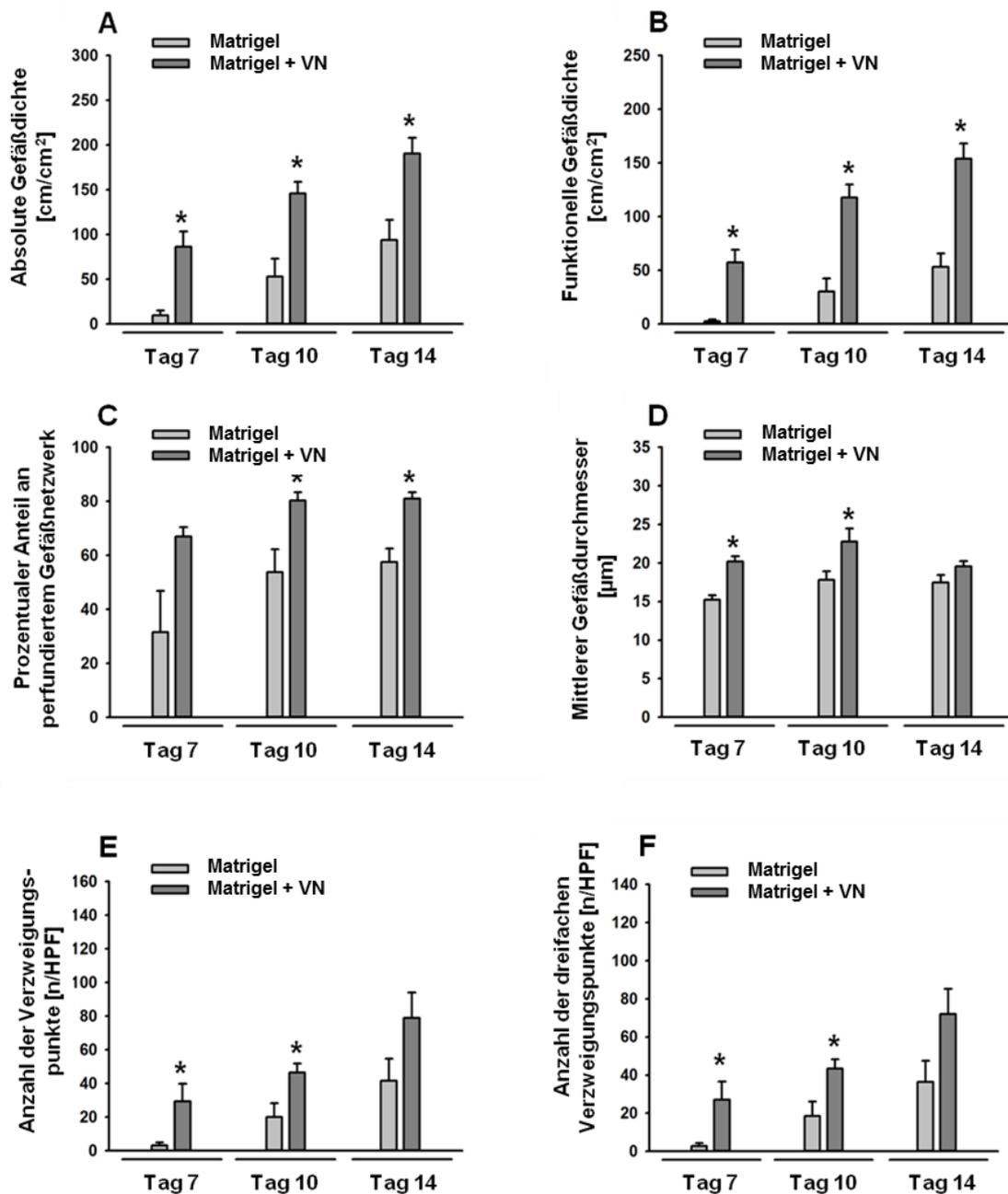


**Abbildung 26:** Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatlager an Tag 14 nach Implantation in WT sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6).

## 2.2. Auswirkung einer bioaktiven Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinatem VN

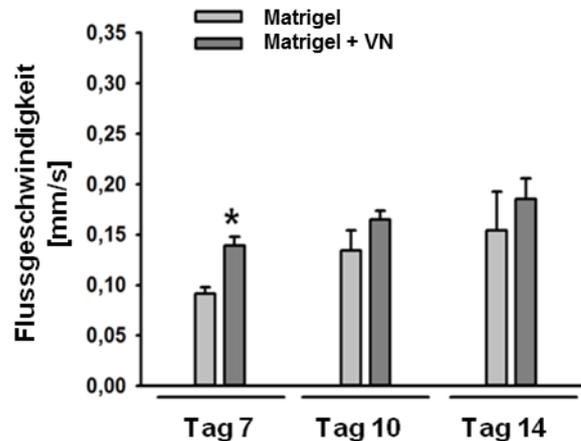
### 2.2.1. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem VN auf die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten

Zu Überprüfung der Relevanz dieser Erkenntnisse für eine mögliche klinische Anwendung wurde wiederum der Effekt einer matrigelbasierten bioaktiven Oberflächenbeschichtung des PPE-Implantatmaterials mittels rekombinatem VN überprüft. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Vaskularisation des Implantatmaterials über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen. Dies gilt sowohl für die absolute als auch die funktionelle Gefäßdichte. Dementsprechend war auch der prozentuale Anteil des perfundierten Netzwerkes am 10. und 14. postoperativen Tag signifikant erhöht. Dies ging mit einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten sowie der mittleren Gefäßdurchmesser im Netzwerk an Tag 7 und 10 einher (vergleiche Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte, prozentualer Anteil des perfundierten Gefäßnetzwerkes (C), mittlere Gefäßdurchmesser (D) sowie Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten (E, F) im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 Tage nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel).

Zudem zeigten sich die im neugebildeten Gefäßnetzwerk erreichten Flussgeschwindigkeiten in der frühen Integrationsphase (Tag 7) signifikant gegenüber den Kontrollexperimenten erhöht (vergleiche Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Flussgeschwindigkeit im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel).

Die durchschnittliche Gefäßsegmentlänge wies hierbei keine signifikanten Veränderungen auf (vergleiche Tabelle 13).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlere Gefäßsegmentlänge [µm]</b>			
Matrigel	64,3±12,78	80,0±5,1	87,1±22,5
Matrigel + VN	103,8±6,9	96,0±3,7	82,7±6,4

**Tabelle 13:** Mittlere Gefäßsegmentlänge in neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6).

Weiterhin ließen sich keine Einflüsse einer Oberflächenbeschichtung des PPE-Implantates auf die mikrovaskulären Parameter im umgebenden Implantatlager feststellen (vergleiche Tabelle 14).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser [cm/cm<sup>2</sup>]</b>			
Matrigel	22,5±3,0	21,5±2,8	17,9±1,4
Matrigel + VN	23,3±0,7	23,5±0,9	19,5±0,9
<b>Mittlere Gefäßdichte [cm/cm<sup>2</sup>]</b>			
Matrigel	273,5±8,4	278,0±20,7	299,9±19,3
Matrigel + VN	287,3±15,3	267,5±15,3	271,7±6,7
<b>Flussgeschwindigkeit [mm/s]</b>			
Matrigel	0,218±0,017	0,200±0,042	0,200±0,015
Matrigel + VN	0,194±0,016	0,200±0,020	0,200±0,024

**Tabelle 14:** Mittlere Gefäßdurchmesser, mittlere Gefäßdichte und Flussgeschwindigkeit in der Mikro-zirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6).

## 2.2.2. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinatem VN auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktionen nach Implantation von PPE-Implantaten

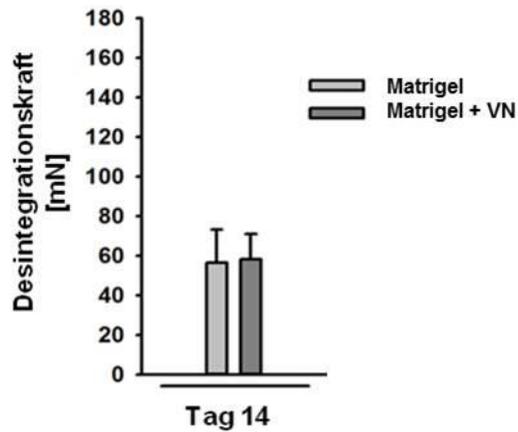
Nach Oberflächenbeschichtung mittels rekombinatem VN zeigten sich sowohl in Bezug auf die Anzahl an rollenden, als auch fest adhärenen Leukozyten im mikrovaskulären Gefäßbett im Implantat selbst sowie im umgebenden Implantatlager keine signifikanten Unterschiede. Auch die systemische Leukozytenzahl am 14. Tag nach Implantation wies keine Veränderung gegenüber den Kontrolltieren auf (vergleiche Tabelle 15).

	Tag 7	Tag 10	Tag 14
<b>Implantatmaterial</b>			
<b>Anzahl an rollenden Leukozyten [n/30s]</b>			
Matrigel	2,5±0,7	1,6±0,5	2,8±0,6
Matrigel + VN	2,8±0,2	1,1±0,2	1,6±0,2
<b>Anzahl an fest adhärennten Leukozyten [n/100µm]</b>			
Matrigel	1,0±0,2	0,9±0,2	0,9±0,1
Matrigel + VN	1,1±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1
<b>Implantatlager</b>			
<b>Anzahl an rollenden Leukozyten [n/30s]</b>			
Matrigel	3,1±0,5	2,8±0,7	3,4±1,1
Matrigel + VN	2,1±0,4	1,7±0,4	1,9±0,4
<b>Anzahl an fest adhärennten Leukozyten [n/100µm]</b>			
Matrigel	1,1±0,2	1,0±0,1	0,7±0,1
Matrigel + VN	1,1±0,1	1,1±0,1	0,9±0,1
<b>Sonstige Parameter</b>			
<b>Systemische Leukozytenzahl [<math>10^3</math> /µl]</b>			
Matrigel			2,8±0,6
Matrigel + VN			3,6±0,3

**Tabelle 15:** Anzahl an rollenden sowie fest adhärennten Leukozyten im Implantat sowie im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates, Systemische Leukozytenzahl an Tag 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN-oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6).

### 2.2.3. Auswirkung einer Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem VN auf die strukturelle Gewebsintegration von PPE

Die strukturelle Gewebsintegration, gemessen an der Desintegrationskraft am 14. postoperativen Tag, stellte sich als nicht durch eine Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem VN beeinflussbar dar (vergleiche Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Desintegrationskraft bei mechanischer Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation (MW $\pm$ SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel).

## IV. Diskussion

### 1. Überlegungen zum *tissue engineering* von PPE-Implantaten für den Einsatz in der kraniofazialen Chirurgie

Im klinischen Alltag ist nach Tumorresektion oder nach ausgeprägten Traumata im Kopf-Hals-Bereich nicht nur eine adäquate Rekonstruktion des Haut-Weichteil-Mantels vonnöten, oft muss zudem das strukturgebende Stützgewebe des Gesichtsschädels rekonstruiert werden. Um Hebedefekte und damit assoziierte Morbidität zu umgehen, kommt als alloplastisches Knorpel/Knochen-Ersatzmaterial PPE zum Einsatz. Zudem gewinnt dieses Material bei Korrekturen von Fehlbildungen, z.B. Mikrotie, sowie bei ästhetischen Indikationen zunehmend an Bedeutung [1, 7-10].

Die klinischen Anwendungsmöglichkeiten des Implantatmaterials sind – trotz eines erfolgreichen Einsatzes am Patienten seit mehreren Jahrzehnten – für bestimmte Indikationen nach wie vor limitiert und mit erhöhten Komplikationsraten behaftet. Hierbei ist vor allem der Einsatz in Bereichen mit insuffizienter Haut-Weichteilbedeckung sowie lokal beeinträchtigten Durchblutungsverhältnissen betroffen [1, 4, 8, 9, 16, 78]. Vor diesem Hintergrund bestehen Bestrebungen, die für eine erfolgreiche Biointegration besonders bedeutsame frühe Phase der Gewebsintegration mit Hilfe von Techniken des *tissue engineering* zu verbessern und zu modifizieren [20, 23, 83, 89, 90, 93, 94, 96].

Den Komponenten des fibrinolytischen Systems, des Plasminogen-Aktivierungs-Systems sowie damit interagierenden Proteinen wie VN kommen, neben der originären Aufgabe der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Fibrinolyse und Hämostase weitere bedeutende Funktionen im Bereich Inflammation, Angiogenese und Wundheilung zu. Zunehmend deutlich wird die Relevanz dieser Proteine für Regulation und Modulation von Zelladhärenz, -migration und -proliferation sowie Leukozytenrekrutierung [48, 53, 66, 68, 69, 102, 103]. Für die Effektorprotease des fibrinolytischen Systems Plasmin wurde in diesem Zusammenhang bereits eine Bedeutung bei der Biointegration von PPE nachgewiesen [113]. Die Rolle der

Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems sowie deren Interaktionspartner VN in diesem Zusammenhang ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Demensprechend ist auch das Potential dieser Proteine für den Einsatz im *tissue engineering* von PPE nicht näher untersucht.

## **2. Diskussion von Material und Methoden**

### **2.1. Relevante Parameter bei der Biointegration von Implantaten**

Die Gewebeintegration von Biomaterialien stellt einen höchst komplexen Vorgang dar, welcher auch auf experimenteller Ebene im Tiermodell noch nicht vollständig verstanden ist. Insbesondere das Zusammenspiel von lokalen und systemischen Faktoren scheint von entscheidender Bedeutung zu sein. Dabei sind initiale Leukozytenrekutierung, Gefäßneubildungen sowie strukturelle Gewebsintegration die entscheidenden Parameter, welche es zur Evaluation der Kompatibilität eines Biomaterials zu beurteilen gilt [21, 22, 129]. Auch wenn bei jedem Experiment stets ein möglichst einfaches Modell mit wohl definierbaren Einflussfaktoren zu wählen ist, sind Daten in Bezug auf diese höchst relevanten Parameter nur im Zuge eines *In-vivo*-Experimentes im Gesamtorganismus zu ermitteln. Neben den Absolutwerten ist hierbei auch die Darstellung des zeitlichen Verlaufes unabdingbar [21, 22].

### **2.2. Intravitalmikroskopie und transparente Rückenhautkammer**

Eine intravitalmikroskopische Visualisierung eben dieser Prozesse erlaubt die repetitive, non-invasive Erhebung der entsprechenden Daten am lebenden Versuchstier. Es bestehen zahlreiche gut etablierte akute und chronische Modelle zur Intravitalmikroskopie an verschiedenen Geweben und Organen.

In der Literatur sind zahlreiche akute intravitalmikroskopische Versuchsanordnungen zur Analyse der Mikrozirkulation in spezifischen Organsystemen, beispielsweise der Leber, des Gehirns oder der Lunge beschrieben [130-132].

Zur simultanen Untersuchung von Leukozyten-Endothelzellinteraktionen und Angiogenese im Implantatmaterial sind jedoch chronische Versuchsansätze notwendig, die idealerweise eine repetitive Versuchsdurchführung am selben Versuchstier erlauben [21, 22].

Diese Vorgänge können unter anderem mittels des *Chorioallantonic-Membrane-Assay* (CAM) am Hühnerei untersucht werden. Hierbei wird die Chorioallantonische Membran, welche dem Hühner-Embryo im Ei als Gasaustauschfläche dient, präpariert und kann Verlauf über etwa 10 Tage intravitalmikroskopisch beobachtet werden. In dieser Membran herrscht enormes angiogenes Potenzial, so dass eingebrachte Biomaterialien rasch vaskularisiert werden [133]. Jedoch weist dieses Modell einige Schwächen in Bezug auf seine Eignung zur Evaluation der Biokompatibilität von Implantatmaterialien auf. Zunächst ist das Huhn als Versuchstier nur schlecht etabliert, da es verglichen mit Säugetieren weniger Parallelen hinsichtlich vieler biologischer Prozesse zum Menschen aufweist. Weiterhin finden die Untersuchungen im embryonalen Gewebe statt, welches sich hinsichtlich zahlreicher Eigenschaften in Bezug auf Leukozytenrekrutierung und Angiogenese deutlich vom adulten Tier unterscheidet. Zudem bestehen in diesem Modell einige versuchstechnische Schwierigkeiten, auf die jedoch im weiteren Verlauf nicht weiter eingegangen werden soll [21].

Als Goldstandard zur intravitalmikroskopischen Darstellung von Leukozytenrekrutierung und Angiogenese im chronischen Versuch, nicht nur im Kontext der Integration von Biomaterialien, gilt das Modell der transparenten Rückenhautkammer [21, 22]. Dieses Modell ist seit geraumer Zeit in entsprechender Adaptation für verschiedene Labornagetiere gut etabliert. So bestehen Kammermodelle für Maus, Ratte, Kaninchen und Goldhamster [122, 124-126, 134]. Seit der Erstbeschreibung durch Algire 1943 konnte durch mehrere Weiterentwicklungen ein standardisiertes und für die Versuchstiere gut verträgliches Kammerdesign herausgearbeitet werden [122]. Als Material für die Kammer kommt Titan zum Einsatz, welches als weitgehend inert anerkannt ist und somit keine lokalen oder systemischen Effekte auf das Versuchstier hat. Durch ein gewichtsoptimiertes Design kann mit einem Gewicht von etwa 5g eine Beeinträchtigung der Versuchstiere in Mobilität und Verhalten weitgehend vermieden werden. Das gut

zugängliche Beobachtungsfenster erlaubt die Intravitalmikroskopie unter bloßer Fixierung des Versuchstieres in einem geeigneten *Restraîner*. Somit ist keine Anästhesie für die entsprechende Messung notwendig, was insbesondere angesichts der berichteten Auswirkungen einer Narkose auf die Mikrozirkulation einen entscheidenden Vorteil darstellt [135].

Zahlreiche vorliegende Studien belegen die exzellente Eignung dieses Modells für die Evaluation der Mikrozirkulation in verschiedenen Tumoren, Gewebstransplantaten und vielen Biomaterialien und Implantaten. Hierbei können Materialien bis zu einer Größe von 5x5x1 mm beurteilt werden [21, 22].

Dementsprechend kam in der vorliegenden Studie das Modell der transparenten Rückenhautkammer der Maus zum Einsatz. Zur Fluoreszenzmarkierung von Blutplasma und Leukozyten kam FITC-Dextran sowie Rhodamin 6G zur Verwendung. Auch diese Fluorophore finden für die entsprechende Anwendung breite Akzeptanz in der Literatur. Kritisch anzumerken ist der fototoxische Effekt der Fluoreszenzfarbstoffe bei langer Expositionszeit in der entsprechenden Wellenlänge. Um dies zu vermeiden, wurde auf eine strikte Einhaltung des Messprotokolls mit minimalen Expositionszeiten in allen Versuchsgruppen geachtet [21, 22, 122, 135].

### **2.3. Versuchstiere**

Aufgrund der großen immunologischen Vergleichbarkeit zum Menschen sowie der Verfügbarkeit von entsprechenden genetisch veränderten Linien wurde als Versuchstier die Maus mit dem genetischen Hintergrund C56BL/6J gewählt. Die jeweiligen uPA, tPA, PAI-1 sowie VN-defizienten Versuchstiere wurden aus kryokonservierten Embryonen generiert und kommerziell bezogen.

uPA-defiziente Versuchstiere wurden wie zuvor beschrieben im Verfahren der gezielten Genmutation erzeugt. Die Versuchstiere zeigen keinen schweren Phänotyp und weisen eine normale Entwicklung, Fertilität und Lebenslänge auf. Es besteht ein erhöhtes Risiko für rektalen Prolaps sowie chronische Wunden im Kopfbereich. Zudem liegt eine diskret erhöhte Thromboserate bei Stimulation mit Endotoxin vor [136].

tPA-defiziente Versuchstiere wurden ebenfalls wie zuvor beschrieben mittels gezielter Genmutation erzeugt. Auch hier zeigen die Versuchstiere keinen schweren Phänotyp und weisen eine normale Entwicklung, Fertilität und Lebenslänge auf. Weiterhin liegt ebenfalls eine erhöhte Thromboserate bei Stimulation mit Endotoxin vor [136].

Zur Generierung der PAI-1-defizienten Versuchstiere kam ebenfalls eine gezielte Genmutation zum Einsatz. Diese Versuchstiere weisen keinen schweren Phänotyp sowie eine normale Entwicklung, Fertilität und Lebenslänge auf. Die Thrombolyse zeigt sich hier diskret erhöht. Dementsprechend liegt eine verringerte Thromboserate bei Stimulation mit Endotoxin vor. Die Hämostase ist jedoch als normal zu bewerten [137].

Auch die VN-defizienten Versuchstiere wurden mittels gezielter Genmutation generiert. Sie sind ohne schweren Phänotyp und zeigen eine normale Entwicklung, Fertilität und Lebenslänge. Hier ist bekannt, dass eine erhöhte Thromboserate nach Gefäßverletzungen vorliegt und die Angiogenese nach Verletzungen verringert ist [138].

#### **2.4. Konfokalmikroskopie und Zwei-Photonen-Mikroskopie**

Ergänzend zu den intravitalmikroskopischen Messungen wurden konfokalmikroskopische Analysen an mittels konventioneller immunhistochemischer Färbung vorbereiteten Implantatproben vorgenommen. Hierbei kann die Lokalisation und Verteilung spezifisch angefärbter Faktoren sowie Zellkomponenten visualisiert werden. Dabei werden das Gewebe oder einzelne Zellen dreidimensional mit hoher Auflösung, aber limitierter Eindringtiefe dargestellt. Zudem erlaubt die Messung von Fluoreszenzintensitäten eine semiquantitative Bestimmung von entsprechenden Proteinkonzentrationen [139, 140].

Weiterhin wurden entsprechend aufbereitete Präparate mittels Multi-Photonen-Mikroskopie untersucht. Hierbei kann beim sogenannten *second harmonic generation imaging* der Effekt genutzt werden, dass beim exakt gleichzeitigen Auftreffen zweier Photonen identischer Wellenlänge in bestimmten Zonen im Gewebe die Emission eines Photons doppelter Wellenlänge

erwirkt werden kann. Somit können beispielsweise Kollagenfasern ohne spezifische Markierung mit hoher Eindringtiefe ins Gewebe und hoher Auflösung dreidimensional dargestellt werden. Über Messung der Signalintensität kann eine semiquantitative Ermittlung der Kollagen-dichte erfolgen [141-143].

## **2.5. Chemotaxis-Assay**

Zur Untersuchung der chemotaktischen Potenz der Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems auf migrierende Endothelzellen kamen Chemotaxiskammern der Firma ibidi zum Einsatz, bei welchen ein entsprechender Chemokin-Gradient in eine spezialisierte Beobachtungskammer eingegossen wird und migrierende Zellen sodann über 20 Stunden verfolgt werden. Dieses Verfahren ist als eines der Standardverfahren zur Beobachtung und Evaluation in Migrationsexperimenten etabliert [144].

## **2.6. Messung der strukturellen Gewebsintegration**

Als äußerst valider Parameter für die mechanische Integration des Implantates in das umliegende Bindegewebe wurde die Bestimmung der maximalen notwendigen Desintegrationskraft gewählt. Hiermit kann ein klinisch höchst relevanter Parameter ermittelt werden, der das Risiko für Implantatdislokationen mit nachfolgender Protrusion durch den Haut-Weichteilmantel unmittelbar abbilden kann. Bereits in vorausgegangenen Arbeiten fand diese Untersuchungsmethode erfolgreich Anwendung [94].

Um eine Manipulation am Implantat vor der eigentlichen Messung möglichst vollständig auszuschließen und einen möglichst direkten Ansatz der Messkraft am Implantat zu gewährleisten, wurde die Fixierung des Implantates an der Messeinheit mikrochirurgisch unter dem Operationsmikroskop vorgenommen. Dennoch ist sicherlich der größte Störfaktor, welcher sich auch in verhältnismäßig großen Standardfehlern bei der statistischen Auswertung der Messwerte widerspiegelt, die Kraftübertragung der Messkraft auf das Implantat. Hier ist es durchaus

möglich, dass, bedingt durch eine gewisse Ungenauigkeit der Messmethode, Unterschiede unter den verschiedenen Versuchsgruppen, beispielsweise bei den Versuchen mit proteinbeschichteten Implantaten, nicht detektiert werden konnten.

## **2.7. Matrigel-basiertes Beschichtungsprotokoll für PPE-Implantate**

Um den Einfluss einer Oberflächenbeschichtung des PPE-Implantatmaterials mit rekombinant erzeugten Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems zu bestimmen, wurde ein spezialisiertes Beschichtungs-Protokoll auf Basis von Matrigel etabliert. Dieser Extrakt extrazellulärer Matrixkomponenten des *Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkomes* polymerisiert bei Körpertemperatur zu einem festen Gel und ist dadurch ideal geeignet, die entsprechenden Proteine im Implantat zu immobilisieren.

Die Verwendung von Matrigel zur Untersuchung des Einflusses einzelner Faktoren auf Angiogenese und Wundheilung *in vivo* und *in vitro* ist in der Literatur weit verbreitet und gut anerkannt [145, 146]. So stellt das *Matrigel-Plug-Assay*, bei dem Matrigel subkutan implantiert und sodann die Vaskularisierung des Materials analysiert wird, ein absolutes Standardverfahren der Angiogeneseforschung dar [147-149]. Um Auswirkungen von in Matrigel üblicherweise zu findenden Wachstumsfaktoren zu minimieren, kam für die Experimente ausschließlich wachstumsfaktorreduziertes GFR-Matrigel zum Einsatz.

Problematisch bei der Verwendung von Matrigel ist jedoch die klinische Anwendbarkeit zu bewerten. Allein aufgrund des Produktionsverfahrens als Extrakt muriner Tumorzellen ist eine Zulassung für die Anwendung am Patienten höchst unwahrscheinlich. Dementsprechend müssen für eine klinische Weiterentwicklung des Beschichtungsverfahrens zwingend andere, bestenfalls bereits zur klinischen Anwendung zugelassene Matrizes wie beispielsweise Fibrin eingesetzt werden [150].

### 3. Ergebnisse uPA, tPA, PAI-1

#### 3.1. Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Biointegration von PPE-Implantaten

Im ersten Versuchsschritt konnte zunächst mittels einer konfokalmikroskopischen Untersuchung von PPE-Gewebsproben aus WT-Versuchstieren die Deposition der Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems uPA, tPA und PAI-1 im Implantatmaterial während der frühen Integrationsphase nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte eine Kolo-kalisation der Proteine mit den Endothelzellen des sich formierenden Gefäßnetzwerkes festgestellt werden. Dieses Ergebnis ergänzt frühere Studien, bei denen gezeigt wurde, dass Endothelzellen *in vitro* uPA, tPA und PAI-1 sezernieren [151-153].

Eine schnelle vaskuläre wie strukturelle Gewebsintegration ist von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Biointegration von PPE-Biomaterialien [20, 22]. Nachdem uPA, tPA und PAI-1 neben ihrer Rolle im fibrinolytischen System auch für die Biointegration von Implantaten relevante Prozesse wie Zellmigration, -adhäsion und -proliferation kontrollieren [66-71, 109-111] sollte nun die Rolle dieser Proteine im Kontext dieser Biointegrationsprozesse *in vivo* untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Teilschritte der funktionellen Biointegration von PPE – initiale Entzündungsreaktion, Vaskularisation und fibrovaskuläre Gewebsintegration – unter Zuhilfenahme von fluoreszenzgestützter Intravitalmikroskopie analysiert. Hierbei kam das gut etablierte und auch für Fragestellungen bezüglich der Biokompatibilität von alloplastischen Implantatmaterialien weit verbreitete Modell der transparenten Rückenhautkammer an der Maus zum Einsatz. Diese Versuchsanordnung erlaubt die repetitive intravitalmikroskopische Darstellung aller relevanten Schritte der funktionellen Gewebsintegration von Biomaterialien *in vivo*. So konnten Leukozyten-Endothelzellinteraktionen, die Vaskularisierung sowie die strukturelle Gewebsintegration repetitiv am wachen Tier dargestellt und evaluiert werden [22, 122].

Zunächst wurde die Relevanz von endogen synthetisiertem uPA, tPA oder PAI-1 im für das jeweilige Protein defizienten Mausmodell überprüft. Dazu wurden PPE-Implantate in die

Rückenhautkammerpräparation von WT, uPA-defizienten, tPA-defizienten sowie PAI-1-defizienten Mäusen eingebracht und die Gefäßbildung im Implantat sowie im Implantatlager an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle drei Proteine von essentieller Bedeutung für die frühe Vaskularisation des Implantatmaterials sind, im genetisch veränderten Versuchstier die Dynamik dieser Prozesse signifikant verändert ist und jeder Komponente des Plasminogen-Aktivierungs-Systems spezifische Funktionen zuzuordnen sind.

Während tPA besonders im frühen Stadium der Implantatintegration von Bedeutung ist, hat uPA über den gesamten Versuchszeitraum nachhaltige Effekte auf die Vaskularisierung des Implantatmaterials. Interessanterweise zeigt auch PAI-1, der primäre Inhibitor der beiden Proteasen uPA und tPA, zu verschiedenen Stadien der PPE-Integration der Vaskularisierung förderliche Effekte. Diese Ergebnisse komplementieren frühere Daten zu nicht-fibrinolytischen Effekten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems im Kontext der Angiogenese [66, 67, 69, 71, 154, 155]. So ist bereits seit längerem bekannt, dass uPA in seinen vielfältigen Interaktionen mit dem uPA-Rezeptor, LRP-1, PAI-1 sowie VN nicht nur die perizelluläre Proteolyse bei der Migration verschiedenster Zellpopulationen, beispielsweise von Endothelzellen und Leukozyten, aber auch von verschiedenen Tumorzelllinien mediiert und moduliert, sondern in entscheidender Weise die Lokalisation und Umverteilung von Integrinen vermittelt und damit unersetzlich für eine erfolgreiche Fortbewegung der Zellen im interstitiellen Raum ist [66]. Dementsprechend wird der uPA-Rezeptor in migrierenden Endothelzellen bei VEGF vermittelter Zellmigration spezifisch zur sogenannten *leading edge* an der Vorderseite der migrierenden Zelle umverteilt. Zudem werden über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, beispielsweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinasen oder die Interaktion mit LRP-1 weitere Effekte des Plasminogen-Aktivierungs-Systems auf Zellproliferation und -migration berichtet [69, 71]. Im Einklang hiermit sind in der Literatur zahlreiche Belege für funktionell relevante Auswirkungen des Plasminogen-Aktivierungs-Systems auf Neovaskularisierung, Angiogenese und Arteriogenese im *In-vivo*-Versuch zu finden. So stellt die über uPA unab-

hängig vom uPA-Rezeptor vermittelte Rekrutierung von Leukozyten in das ischämische Gewebe nach Gefäßverschluss einen für das funktionelle Outcome entscheidenden Schritt im Modell der induzierten Hinterlaufischämie der Maus dar [67]. Weiterhin vermittelt intravenös appliziertes rekombinantes tPA, ebenfalls im Modell der induzierten Hinterlaufischämie, über eine vermehrte Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen eine deutliche Verbesserung der funktionellen Gewebsperfusion [154].

Eine computerassistierte detaillierte Analyse der Gefäßarchitektur des sich neu bildenden Gefäßnetzwerkes im PPE-Implantat zeigte, dass uPA, tPA und PAI-1 vor allem den Grad an Verzweigung und damit die Komplexität des sich entwickelnden Netzwerkes beeinflussen, nicht aber die Länge von einzelnen Netzwerksegmenten. Dies deutet an, dass endogen freigesetztes uPA, tPA und PAI-1 insbesondere die Reifung des sich neu bildenden Gefäßnetzwerkes moduliert, was Arbeiten zum Einfluss dieser Proteine auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Endothelzellen ergänzt [156-158]. Hierbei ist bekannt, dass PAI-1 in Interaktion mit sowie in Analogie zu den zuvor beschriebenen Zusammenhängen für uPA über die Interaktion mit uPA, dem uPA-Rezeptor, VN sowie LRP-1 die für die Zellmigration notwendige zeitliche und örtliche Regulation der perizellulären Proteolyse entscheidend beeinflusst und simultan dazu intrazelluläre Signalwege aktiviert [156]. Weiterhin sind sowohl uPA als auch tPA über rezeptorvermittelte Mechanismen von Bedeutung für Endothelzellproliferation sowie – überleben [157, 158].

Im umliegenden Gewebe zeigten sich, im Gegensatz zu sich neu bildenden Mikrogefäßen im Implantat, keine Auswirkungen einer Defizienz für uPA, tPA oder PAI-1. Damit sind die Proteine im adulten Versuchstier nur für die tatsächliche Neubildung von Gefäßen im eingebrachten Biomaterial, nicht aber für die Aufrechterhaltung eines bestehenden Gefäßnetzwerkes von Bedeutung.

Gemeinsam mit den endothelialen *vessel sprouts* wandern auch Fibroblasten in das PPE-Implantatmaterial ein und sezernieren dort extrazelluläre Matrix sowie Kollagenfasern [94]. Diese Prozesse sind von großer Bedeutung für die strukturelle Integration des Implantatmaterials ins

umliegende Gewebe. Mittels Multi-Photonen-Mikroskopie konnte das sich entwickelnde Kollagenetzwerk im Implantatmaterial visualisiert und quantifiziert werden und damit ein Effekt von uPA, tPA und PAI-1 auf die strukturelle Einbindung des Materials ins umgebende Gewebe nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass uPA, tPA und PAI-1 Proliferation und Kollagensekretion von Fibroblasten anregen [109-111]. Dementsprechend war auch die nötige Desintegrationskraft für die Luxation des Implantates aus dem Implantatlager in uPA, tPA und PAI-1-defizienten Tieren signifikant vermindert.

Nicht-fibrinolytischen Effekten von uPA, tPA und PAI-1 kommt eine große Bedeutung im Rahmen von schweren Entzündungsreaktionen, beispielsweise beim Ischämie-Reperfusionsschaden [102, 103, 159, 160] und bei Sepsis [121], zu. Auch nach der Implantation von Biomaterialien übernimmt die initiale Entzündungsreaktion mit Leukozytenrekrutierung eine Schlüsselrolle bei der Gewebsintegration [22]. Aus diesem Grund wurden Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im Implantat sowie im umliegenden Gewebe intravitalmikroskopisch visualisiert und quantifiziert. Hierbei zeigte sich in den uPA, tPA und PAI-1 defizienten Tieren lediglich zu den ersten Untersuchungszeitpunkten eine signifikante Reduktion der Zahl der am Endothel rollenden Leukozyten im neu gebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial. Die Zahl fest am Endothel adhärrierender Zellen stellte sich jedoch nicht signifikant verändert dar. In den Mikrogefäßen im Implantatlager ließen sich keine Veränderungen der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen feststellen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es, anders als bei schweren Entzündungsreaktionen, nach der Implantation von Biomaterialien nur zu einer moderaten initialen Reaktion, bedingt durch das chirurgische Trauma, kommt. Dies kann erklären, warum die Hauptkomponenten des Plasmionen-Aktivierungssystems nur geringe transiente Einflüsse auf diese Prozesse haben [22].

Weiterhin deuten die Daten der vorliegenden Studie zu Anzahl an Gefäßsegmenten und Anzahl sowie Ordnung von Gefäßverzweigungspunkten auf eine verlangsamte Reifung und Verdichtung des Gefäßnetzwerkes in uPA, tPA sowie PAI-1 defizienten Versuchstieren hin. Ob sich innerhalb eines sich neu bildenden Gefäßnetzwerkes im Adulten abhängig vom Reifegrad

der Gefäße Unterschiede hinsichtlich der Rezeptorausstattung und des Potentials zur Leukozytenrekrutierung im Vergleich zur residenten Mikrozirkulation feststellen lassen, ist bisher in der Literatur nicht berichtet. Jedoch verdichten sich die Hinweise darauf, dass zumindest in embryonalem Gewebe die Leukozytenrekrutierung in sich neu bildenden Gefäßnetzwerken deutlich reduziert ist [161, 162]. Dementsprechend sollte ein Defizit der Gefäßreifung innerhalb neugebildeter Gefäßnetzwerke als Erklärungsmechanismus für die beobachtete reduzierte Leukozytenrekrutierung in der frühen Gewebsintegrationsphase bei uPA, tPA sowie PAI-1 defizienten Versuchstieren nicht außer Acht gelassen werden, zumal diese Effekte in der residenten Mikrozirkulation im Implantatlager nicht zu beobachten waren.

### **3.2. Bedeutung einer Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinanten uPA, tPA und PAI-1**

Trotz der hervorragenden Verträglichkeit von PPE-Biomaterial kommt es bei bestimmten Anwendungen mit ungünstigen Grundvoraussetzungen für die Biointegration von alloplastischen Implantaten häufig zu Komplikationen im postoperativen Verlauf, welche den klinischen Einsatz des Implantatmaterials limitieren. Frühkomplikationen umfassen dabei vor allem ohne Entfernung des Implantates nicht beherrschbare Infektionen im Implantatsitus, Spätkomplikationen hingegen stellen häufig eine sekundäre Implantatdislokation oder eine Arrosion des Implantates durch den Hautmantel in Folge einer insuffizienten Haut-Weichteilbedeckung dar. Insbesondere komplikationsträchtig, und aus diesem Grund mit deutlich erhöhten Raten an Revisionsoperationen oder vollständigem Versagen der Rekonstruktion verbunden, sind Anwendungen in Arealen von natürlicherweise oder iatrogen kompromittierter lokaler Durchblutungssituation [16, 19]. Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Gewebsintegration von porösen Biomaterialien wie PPE ist vor allem die frühe vaskuläre und strukturelle Integration in das umliegende Implantatlager [20-22]. Somit wird das Implantat durch die funktionelle Integration sowohl der körpereigenen Immunabwehr als auch bei Bedarf einer systemischen Antibiotikatherapie zugänglich gemacht. Die Bildung eines Biofilms mit daraus resultierenden

akuten oder subakuten Infektkomplikationen sowie eine Implantatdislokation kann somit effektiv vermieden werden [1, 23, 24].

Verschiedene Ansätze aus dem Bereich des *tissue engineering* versuchen, diese Problematik insbesondere durch eine Beschleunigung der initialen Schritte der Gewebsintegration des Implantates zu adressieren [21, 89, 90, 94].

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse für die Bedeutung von endogenem uPA, tPA und PAI-1 für die Biointegration von PPE-Implantaten wurde zunächst die chemotaktische Potenz dieser Proteine für migrierende Endothelzellen *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich, dass uPA, tPA und PAI-1 einen deutlichen chemotaktischen Stimulus für Endothelzellen darstellen. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass das Plasminogen-Aktivierungs-System VEGF medierte angiogenetische Prozesse moduliert. So vermittelt VEGF-A über Stimulation des VEGF-Rezeptors 2 die Aktivierung der uPA vermittelten perizellulären Proteolyse sowie die Umverteilung des uPA-Rezeptors an die *leading edge* migrierender Endothelzellen. Hier findet nun die Interaktion mit PAI-1, VN, LRP-1 sowie Integrinen, insbesondere Integrin  $\alpha 5\beta 1$  statt. Diese ist von essentieller Bedeutung für eine gerichtete Migration der Endothelzellen [71].

Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf eine klinische Anwendung wurde ein Beschichtungsverfahren für PPE-Implantate entwickelt, bei dem mit uPA, tPA oder PAI-1 angereichertes wachstumsfaktorreduziertes Matrigel zur Beschichtung eingesetzt wurde. Matrigel stellt eine in der Literatur weit verbreitete und gut etablierte Matrix dar, die es ermöglicht, den Einfluss einzelner Faktoren auf Angiogenese und Wundheilung *in vivo* und *in vitro* zu analysieren [145-149, 163]. Um Effekte von in Matrigel vorhandenen Wachstumsfaktoren zu minimieren, kam für die Experimente ausschließlich wachstumsfaktorreduziertes (Growth Factor Reduced/GFR) Matrigel zum Einsatz. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung am Patienten wird es jedoch notwendig sein, diese für einen *proof of principle* gut geeignete Matrix durch eine für die Anwendung am Patienten zugelassene Matrixkomponente zu ersetzen [150].

Im Rückenhautkammermodell konnte intravitalmikroskopisch eine deutlich verbesserte vaskuläre Implantatintegration der proteinbeschichteten Implantate gegenüber nur matrigelbeschichteten Kontrollimplantaten belegt werden. Dabei zeigte tPA vor allem Effekte in der frühen Integrationsphase, wohingegen PAI-1 hauptsächlich für Effekte zu späteren Zeitpunkten verantwortlich war. Herauszuheben ist die deutliche Verbesserung der initialen Gefäßbildung durch eine uPA-Beschichtung, die über die gesamte Beobachtungszeit im Experiment anhielt.

Die Oberflächenbeschichtung mit Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems hatte auf den Bereich des Implantates selbst begrenzte Auswirkungen, im umgebenden Gewebe ließen sich keine Veränderungen feststellen. Auch die initiale Entzündungsreaktion nach Implantation wurde nicht beeinflusst. Die strukturelle Integration des Materials blieb dabei weitgehend unverändert.

### **3.3. Bedeutung der proteolytischen Aktivität für die Effekte von uPA und tPA auf die Biointegration von PPE-Implantaten**

Die beiden Plasminogen-Aktivatoren vermitteln ihre nicht-fibrinolytischen Effekte sowohl über proteolytische sowie nicht-proteolytische Mechanismen [68-71, 113]. Um diese Eigenschaften für die Biointegration von PPE mechanistisch getrennt betrachten zu können, wurden in einer weiteren Versuchsgruppe molekularbiologisch modifizierte Proteine ohne proteolytische Aktivität zum Einsatz gebracht. Eine Oberflächenbeschichtung mit DFP-uPA (dessen proteolytische Aktivität durch Diisopropylfluorophosphat inaktiviert wurde) zeigte pro-angiogenetische Effekte, die im Ausmaß mit den Auswirkungen einer Beschichtung mit proteolytisch aktivem uPA nahezu vergleichbar waren. So konnte durch eine Oberflächenbeschichtung mit DFP-uPA nahezu ein identischer prozentualer Zuwachs in Bezug auf funktionelle und absolute Vaskularisierung des Implantatmaterial im Vergleich zur Matrigel-beschichteten Kontrolle erzielt werden. Beide Parameter zeigten sich sowohl an Tag 7 als auch an Tag 10 nach Implantation signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, bei der Beschichtung mit proteolytisch aktivem uPA setzte sich dieser Effekt jedoch noch bis zum 14. Tag nach Implantation fort, was

sich nun hier für DFP-uPA nicht nachvollziehen ließ. Im Gegensatz dazu konnte eine Oberflächenbeschichtung mit nicht-proteolytisch aktivem tPA, einer gentechnologisch erzeugten Proteinmutante, die vaskuläre Integration von PPE nicht gegenüber der Kontrollgruppe verbessern.

Dies deutet darauf hin, dass die Auswirkungen einer tPA Beschichtung weitgehend auf proteolytischen Funktionen wie einer möglichen Aktivierung von Plasmin und in der Folge von MMPs [113] beruhen, wohingegen uPA sowohl über proteolytische Effekte als auch zusätzlich unabhängig von einer Plasminaktivierung mit Hilfe nicht-proteolytischer Effekte die Integration von PPE-Biomaterial verbessert. Hierfür kommen sowohl direkte, rezeptorvermittelte als auch nicht-rezeptorvermittelte Mechanismen in Frage. uPA unterhält vielfältige Interaktion mit dem uPA-Rezeptor, LRP-1, PAI-1 sowie VN. Dabei wird nicht nur die perizelluläre Proteolyse bei der Endothelzellmigration moduliert, sondern auch die Umverteilung von Integrinen auf der Zelloberfläche sowie deren Rezirkulation an die *leading edge* der migrierenden Zelle in entscheidendem Maße beeinflusst [66]. Dementsprechend ist bei VEGF-A vermittelter Angiogenese sowohl die Aktivierung der perizellulären Proteolyse über uPA als auch die Umverteilung des uPA-Rezeptors an die *leading edge* migrierender Endothelzellen festzustellen. An der *leading edge* findet nun die Interaktion mit uPA PAI-1, VN, LRP-1 sowie Integrinen statt [71]. Hierbei kommt es durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zu einer weiteren Begünstigung endothelialer Migration und Proliferation [69, 71]. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktionen ist nicht nur *in vitro* gut belegt, sondern zeigt sich auch *in vivo* als im Zusammenhang der Gefäßneubildung bei lokaler induzierter Ischämie von entscheidender Bedeutung [67].

## 4. Ergebnisse Vitronektin

### 4.1. Bedeutung von endogenem VN für die Biointegration von PPE-Implantaten

Das matrizelluläre Protein VN extravasiert als Komponente des Wundexsudates spezifisch bereits innerhalb von Stunden im Bereich von Entzündungsreaktionen und Wundheilungsprozessen ins Interstitium und ist dabei an verschiedensten relevanten biologischen Prozessen von Zellmigration und Proliferation über Leukozytenrekrutierung bis zur Angiogenese beteiligt [56, 114, 164]. VN interagiert in diesem Kontext mit zahlreichen für Wundheilung und Gefäßneubildung relevanten Faktoren, unter anderem dem Plasminogen-Aktivierungs-System. So sind die nicht-proteolytischen Eigenschaften von uPA und PAI-1 auf Zelladhäsion und -migration vornehmlich über die Interaktion mit VN, dem uPA-Rezeptor sowie LRP-1 vermittelt [56]. Zudem moduliert VN durch Interaktion mit Integrinen Zelladhärenz und -migration [57, 73, 116-118, 165, 166]. Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit Angiogenese ist hierbei die Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\beta 3$  [114]. Weiterhin potenziert die Interaktion von multimerem VN mit VEGF dessen Wirkung am VEGF-Rezeptor 2 hinsichtlich endothelialer Migration und Kapillarformierung [73]. Diese Interaktionen weisen auch *in vivo* funktionelle Relevanz auf. So zeigte sich in VN defizienten Versuchstieren eine deutlich gestörte Wundheilung von Hautwunden, bei der es aufgrund einer verminderten Neovaskularisierung im Wundrand zu einem verzögerten Heilungsverlauf sowie repetitiven Einblutungen kam [164].

Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass VN auch innerhalb der Poren von frisch implantiertem PPE-Biomaterial konfokalmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Eine präferentielle Kolokalisation mit endothelialen *sprouts* oder Leukozyten ließ sich in unseren Experimenten jedoch nicht nachweisen, VN zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum gleichmäßig in den Implantatporen verteilt. Auch die semiquantitativ über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmte Proteinkonzentration stellte sich hierbei konstant dar.

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz von endogenem VN für die Biointegration von PPE wurde wiederum in Analogie zu den in IV. 3. 1. beschriebenen Versuchen das Modell der

transparenten Rückenhautkammer zur Analyse von Vaskularisation, Leukozyten-Endothelzellinteraktionen und funktioneller Gewebsintegration zum Einsatz gebracht.

Dabei zeigte sich, dass endogenes VN von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche vasculäre Integration des Implantatmaterials ist. Ähnlich wie bei den Knock-Out Experimenten für uPA lässt sich eine deutlich verminderte funktionelle wie absolute Vaskularisation des Implantatmaterials über den gesamten Versuchszeitraum feststellen. Zudem ist der prozentuale Anteil an funktionalen Gefäßen am Gesamtnetzwerk in den VN-defizienten Tieren über die gesamte Versuchsdauer reduziert. Weiterhin zeigt sich der Organisationsgrad des sich entwickelnden Gefäßnetzwerkes hinsichtlich Komplexität und Dichte vermindert. Darüber hinaus jedoch – und anders als bei den Versuchen im uPA, tPA oder PAI-1 defizienten Versuchstier – stellten sich auch Parameter hinsichtlich der Funktionalität der einzelnen Gefäßsegmente als in der initialen Gewebsintegrationsphase deutlich gestört dar. So ließ sich eine signifikante Verminderung der Blutflussgeschwindigkeiten und mittleren Gefäßdurchmesser im Implantatmaterial feststellen. Diese Daten erweitern Untersuchungen, die zeigten, dass VN unabdingbar für das erfolgreiche Zusammenspiel von Angiogenese und Wundheilung ist [56, 114, 164, 167-170]. So reguliert VN beispielsweise die endotheliale Expression der im Kontext der Angiogenese essentiellen MMP9 über eine Interaktion mit den ebenfalls bei Prozessen der Gefäßneubildung unabdingbaren Integrinen  $\alpha 5\beta 1$  sowie  $\alpha v\beta 3$  [169]. Zudem sind die mannigfaltigen Interaktionen mit dem bereits eingehend beschriebenen System aus uPA, uPA-Rezeptor, PAI-1 sowie dem LRP-1 von entscheidender Bedeutung für die Steuerung von perizellulärer Proteolyse sowie endothelialer Migration und Proliferation [56, 114]. Aber auch die Regulation der Gefäßneubildung wird durch die Interaktion von VN mit antiangiogenen Faktoren nachhaltig beeinflusst. So konnten die antiangiogenen Funktionen von Anastellin, Antithrombin sowie Endostatin in VN-defizienten Versuchstieren nahezu vollständig aufgehoben werden. Somit moduliert VN das Zusammenspiel von pro- zu antiangiogenen Faktoren maßgeblich [167]. Die funktionelle Relevanz dieser Effekte *in vivo* ist dabei durch eine deutliche Störung der Wundheilung bei Hautwunden in VN-defizienten Versuchstieren belegt. So zeigte sich der Wundver-

schluss ebenso wie die Angiogenese im Wundrand verzögert, gleichzeitig wiesen die genetisch veränderten Tiere hierbei eine deutlich erhöhte Rate an Einblutungen im Wundareal auf [164].

Im umgebenden Gewebe, in dem keine Gefäßneubildung erforderlich ist, zeigten sich keine Effekte einer VN-Defizienz auf das residente Gefäßbett im Implantatlager.

Interessanterweise konnten, ähnlich wie bei uPA, tPA und PAI-1, keine deutlichen Auswirkungen auf die initiale Entzündungsreaktion und Leukozytenrekrutierung nach PPE-Implantation, sowohl im Implantatmaterial selbst wie auch im umgebenden Implantatlager nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebenen Integrin-vermittelten Effekte von VN auf leukozytäre Funktionen konnten somit auf Ebene der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im Kontext der Gewebsintegration von Biomaterialien nicht nachvollzogen werden [171-173]. *In vivo* für die Leukozytenrekrutierung funktionell relevante Effekte konnten für VN im Kontext von starken inflammatorischen Stimuli, beispielsweise im Thioglycolat-induzierten Peritonitismodell nach 72 Stunden nachgewiesen werden [119]. Somit mögen zu schweren systemischen Infektmodellen analoge Mechanismen im Rahmen der Biointegration von PPE nicht oder nur in geringem Umfang von Relevanz sein. Zudem können diese Effekte bereits vor dem ersten Untersuchungszeitpunkt (nach 7 Tagen) abgelaufen und somit während des Untersuchungszeitraumes von Tag 7 bis 14 nach Implantation nicht mehr auf Ebene der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen detektierbar sein.

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf eine Beeinflussung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von Fibroblasten und Keratinozyten durch VN *in vitro* [116, 174, 175]. Anders als uPA, tPA oder PAI-1 defiziente Tiere zeigten VN-defiziente Tiere jedoch keine Einbußen in Bezug auf die strukturelle Integration von PPE-Implantaten. Dementsprechend ist VN zwar essentiell für die vaskuläre Integration, hat jedoch für die strukturelle Integration des Implantatmaterials in das umliegende Gewebe nur eine untergeordnete Bedeutung. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass die Biointegration des PPE-Implantates nach dem Beobach-

tungszeitraum von 14 Tagen nicht vollständig abgeschlossen ist und das Implantat den vorliegenden Ergebnissen zufolge im WT-Tier zwar vollständig von einem funktionellen Gefäßnetzwerk durchspannt ist, die weitere Integration ins umliegende Bindegewebe jedoch noch fortschreitet [2, 5, 85-88, 94]. Dementsprechend können mäßig ausgeprägte Auswirkungen auf Fibroblastenmigration und –proliferation auch noch zu späteren Untersuchungszeitpunkten zum Tragen kommen.

#### **4.2. Bedeutung einer Oberflächenbeschichtung von PPE-Implantaten mit rekombinantem VN für deren Biointegration**

Endogenes VN vermag, neben seiner Funktion für Zellmigration [118, 176-178] und Angiogenese [114, 117, 164], spezifisch durch die Vermittlung von Wachstumsfaktoren Prozesse der Wundheilung *in vivo* beschleunigen [117, 179, 180]. Hierfür bestehen neben tierexperimentellen Belegen bereits erste erfolgreiche Therapieversuche am menschlichen Patienten, bei denen Komplexe aus VN und verschiedenen Wachstumsfaktoren zur Behandlung von Verbrennungen und chronischen Wunden zum Einsatz kommen [181-183]. Da endogenes VN die Integrationsprozesse von PPE-Biomaterial essentiell reguliert, wurden diese Ergebnisse mittels eines Beschichtungsansatzes in einen klinisch relevanten Kontext übertragen. Analog zu den Versuchen in IV. 3. 2. wurden PPE-Implantate mit VN und Matrigel beschichtet und intravital-mikroskopisch nach Implantation in die transparente Rückenhautkammer untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Oberflächenbeschichtung die vaskuläre Integration von PPE-Implantaten gegenüber einer alleinigen Matrigelbeschichtung deutlich verbessert, während das umliegende Gewebe nicht beeinflusst wird. In der initialen Integrationsphase stellte sich eine signifikant verbesserte absolute und funktionelle Gefäßdichte dar. Zudem wies das Gefäßnetzwerk eine deutlich verbesserte prozentuale Funktionalität sowie einen höheren Organisationsgrad auf. Interessanterweise war hierbei auch die Funktion des einzelnen Gefäßsegmentes, gemessen an Blutflussgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser, zumindest zu den ersten Un-

tersuchungszeitpunkten, deutlich verbessert. Die initiale Entzündungsreaktion sowie die strukturelle Integration des Implantates wurden durch diese Oberflächenbeschichtung nicht beeinträchtigt.

## 5. Ergebniszusammenfassung und Implikationen für eine klinische Weiterentwicklung

Aufgrund der – trotz der hervorragenden Biokompatibilität – vorliegenden Limitationen von PPE-Implantaten in der klinischen Anwendung gibt es zahlreiche Ansätze, mit Hilfe von *tissue engineering* insbesondere die frühe Phase der Gewebsintegration des Implantatmaterials zu beschleunigen, um somit das Anwendungsspektrum zu erweitern.

Bereits erfolgreich für bestimmte Indikationen im klinischen Alltag eingesetzt wird eine sehr unspezifische, jedoch auch hinsichtlich Patientensicherheit und intraoperativer Praktikabilität vollkommen unproblematische Methode. Hierbei wird das Implantatmaterial vor Implantation mit oxidiertem Zellulose und Patientenblut beschichtet, welches neben zahlreichen unspezifischen Faktoren im Blutserum und zellulären Komponenten unter anderem auch Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems sowie VN enthält [100, 101].

Tierexperimentell etabliert wurden bereits verschiedene Beschichtungsansätze mit Wachstumsfaktoren sowie die präoperative Kultivierung des Implantatmaterials mit Zellen oder Gewebsfragmenten [20, 23, 83, 89-96]. Hierbei werfen sich jedoch Fragen bezüglich der Patientensicherheit, insbesondere im Hinblick auf onkologische Aspekte, sowie bezüglich der prä- und intraoperativen Praktikabilität auf [23, 97, 98]. Demzufolge versuchen aktuelle Ansätze im *tissue engineering* mittels minimaler Intervention endogene Prozesse zu beeinflussen und zu modulieren [21, 89, 99].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Kontext der Interaktionen der biologischen Prozesse von Entzündungsreaktionen, Blutgerinnung und Wundheilung Kompen-

ten aus dem fibrinolytischen System bzw. matrizelluläre Bindeproteine die Einheilung von Biomaterialien aus PPE massiv beeinflussen und diese Effekte für die therapeutische Anwendung nutzbar gemacht werden können.

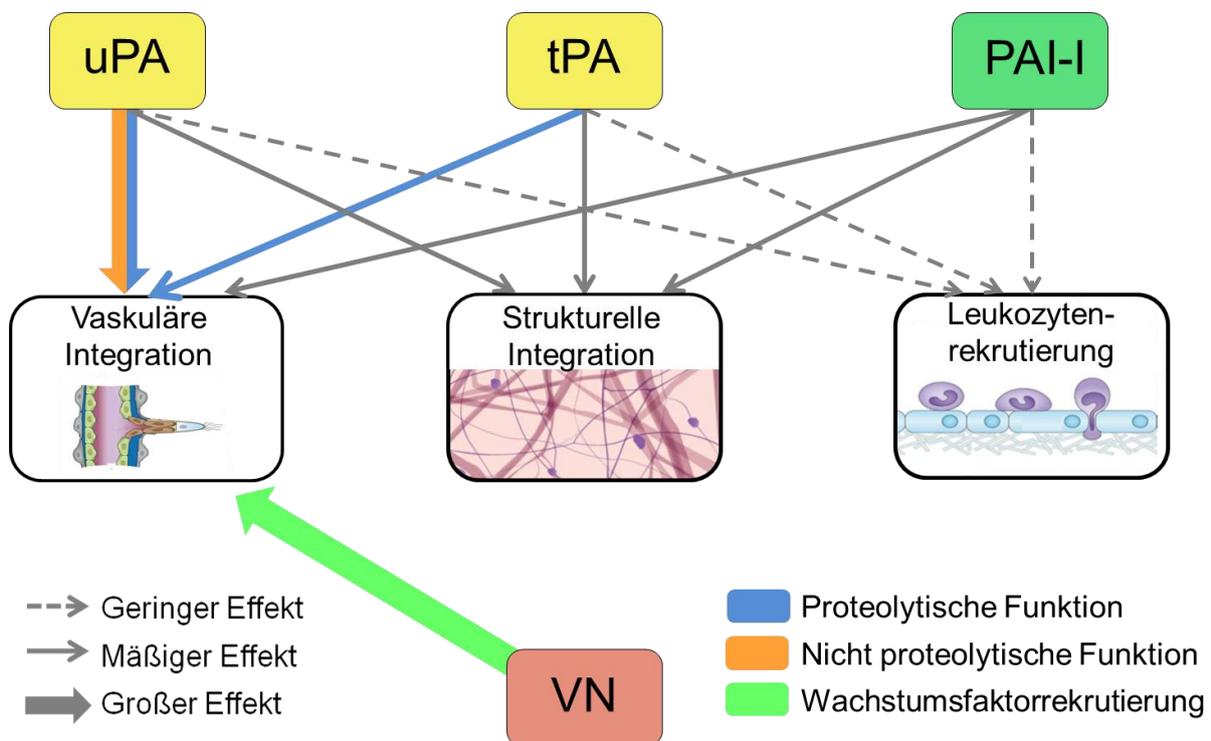
Dabei moduliert endogenes PAI-1 vor allem die initiale Phase der vaskulären Gewebsintegration, wohingegen endogenes tPA insbesondere zu späteren Zeitpunkten funktionell relevante Effekte zeigt. Endogenes uPA dagegen ist von essentieller Bedeutung für alle Phasen der vaskulären Gewebsintegration von PPE. Immunologische Effekte auf Ebene der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen sind im Zusammenhang der Biointegration von PPE nur im geringen Maße durch uPA, tPA oder PAI-1 vermittelt. Die mechanische Gewebsintegration von PPE zeigt sich jedoch deutlich von uPA, tPA oder PAI-1 abhängig.

uPA, tPA oder PAI-1 stellen einen starken chemotaktischen Stimulus für migrierende Endothelzellen dar. Demzufolge lässt sich durch eine Oberflächenbeschichtung von PPE mit rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 eine deutliche Verbesserung der funktionellen vaskulären Gewebsintegration des Materials in der frühen Integrationsphase erreichen. Die immunologischen Eigenschaften auf Ebene der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen in Implantat und Implantatlager bleiben hierdurch ebenso wie die strukturelle Integration des Materials unbeeinflusst.

Die Effekte der proteolytisch aktiven Enzyme uPA und tPA auf die frühe Gefäßbildung im PPE zeigen sich hierbei für tPA weitgehend über proteolytische Funktionen vermittelt, wohingegen für uPA sowohl proteolytische als auch nicht proteolytische Funktionen zum Tragen kommen.

Endogenes VN ist von essentieller Bedeutung für die Vaskularisation von PPE-Implantatmaterial. Dabei ist nicht nur die Dynamik der Gefäßneubildung, sondern auch die Funktionalität der gebildeten Gefäße auf Ebene des Einzelgefäßes sowie auf Netzwerkebene im VN-defizienten Versuchstier massiv beeinträchtigt. Die Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation in Implantat und Implantatlager zeigt sich jedoch nicht von endogenem VN abhängig. Ebenso ist die mechanische Gewebsintegration von PPE ins Implantatlager nicht maßgeblich von endogenem VN beeinflusst.

VN trägt nach Implantation von PPE in deutlichem Umfang zur Rekrutierung von proangiogenen Wachstumsfaktoren in das Implantatmaterial bei [56, 114, 164, 167-170]. Demzufolge ist die frühe Vaskularisation von PPE-Implantaten nach Oberflächenbeschichtung mittels VN maßgeblich akzeleriert. Zudem ist die Funktionalität des ausgebildeten Gefäßnetzwerkes in der initialen Integrationsphase verbessert. Die leukozytäre Entzündungsreaktion sowie die mechanische Integration des Implantatmaterials bleiben unbeeinträchtigt (vergleiche Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Schematische Ergebniszusammenfassung: Bedeutung von uPA, tPA und PAI-1 sowie VN für die funktionelle Biointegration von PPE-Implantaten hinsichtlich vaskulärer Gewebsintegration, struktureller Gewebsintegration und Leukozytenrekrutierung.

Somit konnten unsere Ergebnisse neue Einblicke in die Integrationsprozesse nach Implantation von Biomaterialien wie PPE liefern. Dabei wird eine tragende Rolle des fibrinolytischen Systems und assoziierter Proteine wie VN im Kontext der Interaktion von Hämostase, Entzündung und Wundheilung deutlich. Zudem konnte im Sinne eines *proof of principle* der Beleg erbracht werden, dass eine Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem uPA, tPA, PAI-1 oder VN die frühe Gewebsintegration von PPE verbessern kann und somit eine Strategie zur

Verbesserung der Patientenversorgung bei ungünstigen lokalen oder systemischen Voraussetzungen für eine Defektrekonstruktion mittels PPE-Implantaten liefern kann. Dabei kommen gemäß aktueller Ansätze im *tissue engineering* mikromodulatorische Interventionen zum Einsatz, die lediglich durch eine Beeinflussung des lokalen Mikroenvironments endogene Heilungsprozesse modifizieren und intensivieren.

## V. Literatur

- [1] Yaremchuk MJ. Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111:1818-27.
- [2] Gosain AK. Biomaterials for reconstruction of the cranial vault. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116:663-6.
- [3] Cabin JA, Bassiri-Tehrani M, Sclafani AP, Romo T, 3rd. Microtia reconstruction: autologous rib and alloplast techniques. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2014;22:623-38.
- [4] Patel K, Brandstetter K. Solid Implants in Facial Plastic Surgery: Potential Complications and How to Prevent Them. *Facial Plast Surg.* 2016;32:520-31.
- [5] Cho YR, Gosain AK. Biomaterials in craniofacial reconstruction. *Clin Plast Surg.* 2004;31:377-85, v.
- [6] Potter JK, Malmquist M, Ellis E, 3rd. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2012;24:609-27.
- [7] Berghaus A, Stelter K, Naumann A, Hempel JM. Ear reconstruction with porous polyethylene implants. *Adv Otorhinolaryngol.* 2010;68:53-64.
- [8] Menderes A, Baytekin C, Topcu A, Yilmaz M, Barutcu A. Craniofacial reconstruction with high-density porous polyethylene implants. *J Craniofac Surg.* 2004;15:719-24.
- [9] Gosau M, Schiel S, Draenert GF, Ihrler S, Mast G, Ehrenfeld M. [Craniofacial augmentation with porous polyethylene implants (Medpor: first clinical results)]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006;10:178-84.
- [10] Berghaus A. Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol.* 1985;111:154-60.
- [11] Niechajev I. Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (medpor): long-term results. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36:917-27.
- [12] Ridwan-Pramana A, Wolff J, Razieli A, Ashton-James CE, Forouzanfar T. Porous polyethylene implants in facial reconstruction: Outcome and complications. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43:1330-4.
- [13] Jung SK, Cho WK, Paik JS, Yang SW. Long-term surgical outcomes of porous polyethylene orbital implants: a review of 314 cases. *Br J Ophthalmol.* 2012;96:494-8.
- [14] Skouras A, Skouras G, Karypidis D, Asimakopoulou FA. The use of Medpor(c) alloplastic material in rhinoplasty: experience and outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65:35-42.
- [15] Peled ZM, Warren AG, Johnston P, Yaremchuk MJ. The use of alloplastic materials in rhinoplasty surgery: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121:85e-92e.
- [16] Stelter K, Strieth S, Berghaus A. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology.* 2007;45:325-31.

- [17] Rubin JP, Yaremchuk MJ. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:1336-53.
- [18] Villarreal PM, Monje F, Morillo AJ, Junquera LM, Gonzalez C, Barbon JJ. Porous polyethylene implants in orbital floor reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109:877-85; discussion 86-7.
- [19] Kim SG, Kim YU, Park JC, Oh YK. Effects of presurgical and post-surgical irradiation on the healing process of Medpor in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30:438-42.
- [20] Ehrmantraut S, Naumann A, Willnecker V, Akinyemi S, Korbel C, Scheuer C, et al. Vitalization of porous polyethylene (Medpor(R)) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:1562-72.
- [21] Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 2006;12:2093-104.
- [22] Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater.* 2011;22:147-64; discussion 64-7.
- [23] Laschke MW, Augustin V, Kleer S, Tschernig T, Menger MD. Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor(R)). *Acta Biomater.* 2014;10:4661-9.
- [24] Walker TJ, Toriumi DM. Analysis of Facial Implants for Bacterial Biofilm Formation Using Scanning Electron Microscopy. *JAMA Facial Plast Surg.* 2016;18:299-304.
- [25] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20:86-100.
- [26] Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem.* 2008;8:270-80.
- [27] Gray JJ. The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14:110-5.
- [28] Keselowsky BG, Bridges AW, Burns KL, Tate CC, Babensee JE, LaPlaca MC, et al. Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials. *Biomaterials.* 2007;28:3626-31.
- [29] Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010;12:188-96.
- [30] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:678-89.
- [31] Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003;24:327-34.

- [32] Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:366-78.
- [33] Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med.* 2001;194:205-18.
- [34] Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med.* 2003;197:1355-63.
- [35] Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26:477-89.
- [36] Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995;80:413-22.
- [37] Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2015;147:123-35.
- [38] Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med.* 2001;193:1149-58.
- [39] Huo YQ, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2000;87:153-9.
- [40] Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity.* 2004;20:393-406.
- [41] Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood.* 2002;99:336-41.
- [42] Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science.* 1998;279:381-4.
- [43] Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:546-59.
- [44] Chigaev A, Zwartz G, Graves SW, Dwyer DC, Tsuji H, Foutz TD, et al. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J Biol Chem.* 2003;278:38174-82.
- [45] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203:2569-75.

- [46] Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 2005;26:157-65.
- [47] Voisin MB, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun.* 2013;5:336-47.
- [48] Reichel CA, Kanse SM, Krombach F. At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade. *Trends Cardiovasc Med.* 2012;22:192-6.
- [49] Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res.* 2015;107:321-30.
- [50] Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17:1381-90.
- [51] Lerchenberger M, Uhl B, Praetner M, Khandoga A, Krombach F, Reichel CA. Matrix metalloproteinases promote interstitial migration of leukocytes. *J Vasc Res.* 2011;48:249-.
- [52] Lerchenberger M, Uhl B, Stark K, Zuchtriegel G, Eckart A, Miller M, et al. Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. *Blood.* 2013;122:770-80.
- [53] Reichel CA, Lerchenberger M, Uhl B, Rehberg M, Berberich N, Zahler S, et al. Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature. *PLoS One.* 2011;6:e17229.
- [54] Das R, Pluskota E, Plow EF. Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20:120-4.
- [55] Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:23-36.
- [56] Preissner KT, Reuning U. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37:408-24.
- [57] Chavakis T, Kanse SM, Yutzy B, Lijnen HR, Preissner KT. Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface and extracellular matrix by trapping soluble urokinase receptor-urokinase complexes. *Blood.* 1998;91:2305-12.
- [58] Keck T, Balcom JH, Fernandez-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology.* 2002;122:188-201.
- [59] Boyle MD, Chiodo VA, Lawman MJ, Gee AP, Young M. Urokinase: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol.* 1987;139:169-74.
- [60] Jones JA, McNally AK, Chang DT, Qin LA, Meyerson H, Colton E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2008;84:158-66.

- [61] Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22:617-25.
- [62] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-4.
- [63] Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997;173:206-10.
- [64] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473:298-307.
- [65] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100:782-94.
- [66] Stefansson S, Lawrence DA. Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration. *Sci STKE.* 2003;2003:pe24.
- [67] Deindl E, Ziegelhoffer T, Kanse SM, Fernandez B, Neubauer E, Carmeliet P, et al. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J.* 2003;17:1174-6.
- [68] van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:716-28.
- [69] Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost.* 2007;97:336-42.
- [70] Brodsky S, Chen J, Lee A, Akassoglou K, Norman J, Goligorsky MS. Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H1784-92.
- [71] Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr.* 2012;6:535-615.
- [72] Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129:307-21.
- [73] Li R, Luo M, Ren M, Chen N, Xia J, Deng X, et al. Vitronectin regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Vasc Res.* 2014;51:110-7.
- [74] De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:639-49.
- [75] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389-95.
- [76] Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011;55:261-8.
- [77] Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005;7:452-64.
- [78] Romo T, 3rd, Sclafani AP, Sabini P. Use of porous high-density polyethylene in revision rhinoplasty and in the platyrrhine nose. *Aesthetic Plast Surg.* 1998;22:211-21.

- [79] Sclafani AP, Romo T, 3rd, Silver L. Clinical and histologic behavior of exposed porous high-density polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99:41-50.
- [80] Spector M, Flemming WR, Kreutner A. Bone growth into porous high-density polyethylene. *J Biomed Mater Res.* 1976;10:595-603.
- [81] Spector M, Flemming WR, Sauer BW. Early tissue infiltrate in porous polyethylene implants into bone: a scanning electron microscope study. *J Biomed Mater Res.* 1975;9:537-42.
- [82] Spector M, Harmon SL, Kreutner A. Characteristics of tissue growth into Proplast and porous polyethylene implants in bone. *J Biomed Mater Res.* 1979;13:677-92.
- [83] Soparkar CN, Wong JF, Patrinely JR, Appling D. Epidermal and fibroblast growth factors enhance fibrovascular integration of porous polyethylene implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2000;16:337-40.
- [84] Patel PJ, Rees HC, Olver JM. Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: fibrovascularization of porous polyethylene orbital floor implants in humans. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:400-3.
- [85] Jordan DR, Brownstein S, Dorey M, Yuen VH, Gilberg S. Fibrovascularization of porous polyethylene (Medpor) orbital implant in a rabbit model. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2004;20:136-43.
- [86] Rubin PA, Popham JK, Bilyk JR, Shore JW. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1994;10:96-103.
- [87] Bigham WJ, Stanley P, Cahill JM, Jr., Curran RW, Perry AC. Fibrovascular ingrowth in porous ocular implants: the effect of material composition, porosity, growth factors, and coatings. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1999;15:317-25.
- [88] Karesh JW, Dresner SC. High-density porous polyethylene (Medpor) as a successful anophthalmic socket implant. *Ophthalmology.* 1994;101:1688-95; discussion 95-6.
- [89] Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD. Pre-cultivation of adipose tissue-derived microvascular fragments in porous scaffolds does not improve their in vivo vascularisation potential. *Eur Cell Mater.* 2015;29:190-200; discussion -1.
- [90] Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, et al. Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater.* 2012;24:266-77.
- [91] Kim NJ, Choung HK, Khwarg SI. The survival of freely grafted orbital fat on porous polyethylene orbital implants in the rabbit. *Korean J Ophthalmol.* 2006;20:143-6.
- [92] Monroy A, Kojima K, Ghanem MA, Paz AC, Kamil S, Vacanti CA, et al. Tissue engineered cartilage "bioshell" protective layer for subcutaneous implants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007;71:547-52.

- [93] Hussain T, Schneider M, Summer B, Strieth S. Pre-operative in vitro fibroblast coating of porous polyethylene compound grafts - Cell survival in vivo and effects on biocompatibility. *Biomed Mater Eng.* 2016;27:237-49.
- [94] 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;93:1566-73.
- [95] Nicaeus TE, Tolentino MJ, Adamis AP, Rubin PA. Sucralfate and basic fibroblast growth factor promote endothelial cell proliferation around porous alloplastic implants in vitro. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1996;12:235-9.
- [96] Park WC, Han SK, Kim NJ, Chung TY, Khwarg SI. Effect of basic fibroblast growth factor on fibrovascular ingrowth into porous polyethylene anophthalmic socket implants. *Korean J Ophthalmol.* 2005;19:1-8.
- [97] Herbst RS, Onn A, Mendelsohn J. The role of growth factor signaling in malignancy. *Cancer Treat Res.* 2003;115:19-72.
- [98] Denduluri SK, Idowu O, Wang Z, Liao Z, Yan Z, Mohammed MK, et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis.* 2015;2:13-25.
- [99] Martino MM, Tortelli F, Mochizuki M, Traub S, Ben-David D, Kuhn GA, et al. Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing. *Sci Transl Med.* 2011;3:100ra89.
- [100] Erol OO. The Turkish delight: a pliable graft for rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105:2229-41; discussion 42-3.
- [101] Richardson S, Agni NA, Pasha Z. Modified Turkish delight: morcellized polyethylene dorsal graft for rhinoplasty. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40:979-82.
- [102] Reichel CA, Uhl B, Lerchenberger M, Pühr-Westerheide D, Rehberg M, Liebl J, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Circulation.* 2011;124:1848-59.
- [103] Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, et al. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1495-504.
- [104] Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood.* 2016;128:753-62.
- [105] Del Rosso M, Margheri F, Serrati S, Chilla A, Laurenzana A, Fibbi G. The urokinase receptor system, a key regulator at the intersection between inflammation, immunity, and coagulation. *Curr Pharm Des.* 2011;17:1924-43.
- [106] Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol.* 2012;92:509-19.

- [107] Sheehan JJ, Tsirka SE. Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review. *Glia*. 2005;50:340-50.
- [108] McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;36:184-94.
- [109] Shetty S, Kumar A, Johnson AR, Pueblitz S, Holiday D, Raghu G, et al. Differential expression of the urokinase receptor in fibroblasts from normal and fibrotic human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:78-87.
- [110] Hao S, Shen H, Hou Y, Mars WM, Liu Y. tPA is a potent mitogen for renal interstitial fibroblasts: role of beta1 integrin/focal adhesion kinase signaling. *Am J Pathol*. 2010;177:1164-75.
- [111] Zhang YP, Wang WL, Liu J, Li WB, Bai LL, Yuan YD, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca(2+) signaling. *Thromb Res*. 2013;131:64-71.
- [112] Huang Y, Noble N. An unexpected role of plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1) in renal fibrosis. *Kidney Int*. 2005;67:2502-3.
- [113] Busuttill SJ, Ploplis VA, Castellino FJ, Tang L, Eaton JW, Plow EF. A central role for plasminogen in the inflammatory response to biomaterials. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1798-805.
- [114] Leavesley DI, Kashyap AS, Croll T, Sivaramakrishnan M, Shokoohmand A, Hollier BG, et al. Vitronectin--master controller or micromanager? *IUBMB Life*. 2013;65:807-18.
- [115] Hess S, Kanse SM, Kost C, Preissner KT. The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin. *Thromb Haemost*. 1995;74:258-65.
- [116] Hollier B, Harkin DG, Leavesley D, Upton Z. Responses of keratinocytes to substrate-bound vitronectin: growth factor complexes. *Exp Cell Res*. 2005;305:221-32.
- [117] Schoppet M, Chavakis T, Al-Fakhri N, Kanse SM, Preissner KT. Molecular interactions and functional interference between vitronectin and transforming growth factor-beta. *Lab Invest*. 2002;82:37-46.
- [118] Stahl A, Mueller BM. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int J Cancer*. 1997;71:116-22.
- [119] Li R, Ren M, Chen N, Luo M, Zhang Z, Wu J. Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS One*. 2012;7:e37195.
- [120] Preissner KT. Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:966-71.
- [121] Abraham E, Gyetko MR, Kuhn K, Arcaroli J, Strassheim D, Park JS, et al. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. *J Immunol*. 2003;170:5644-51.

- [122] Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.* 1993;143:1055-62.
- [123] Algire GH. An Adaptation of the Transparent-Chamber Technique to the Mouse. *Journal of the National Cancer Institute.* 1943;4:1-11.
- [124] Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH. Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res.* 1970;2:67-76.
- [125] Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie.* 1980;177:125-34.
- [126] Nolte D, Menger MD, Messmer K. Microcirculatory models of ischaemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1995;15 Suppl 1:9-16.
- [127] Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl).* 1997;42:168-75.
- [128] Arganda-Carreras I, Fernandez-Gonzalez R, Munoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech.* 2010;73:1019-29.
- [129] Laschke MW, Haufel JM, Thorlaciuss H, Menger MD. New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74:696-704.
- [130] Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol (1985).* 2008;104:338-46.
- [131] Marques PE, Oliveira AG, Chang L, Paula-Neto HA, Menezes GB. Understanding liver immunology using intravital microscopy. *J Hepatol.* 2015;63:733-42.
- [132] Cabrales P, Carvalho LJ. Intravital microscopy of the mouse brain microcirculation using a closed cranial window. *J Vis Exp.* 2010.
- [133] Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, et al. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *J Vis Exp.* 2009.
- [134] Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res.* 1979;18:311-8.
- [135] Messmer K, Krombach F. [Microcirculation research in experimental surgery]. *Chirurg.* 1998;69:333-8.
- [136] Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994;368:419-24.

- [137] Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest*. 1993;92:2746-55.
- [138] Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC, Ginsburg D. Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12426-30.
- [139] Jonkman J, Brown CM. Any Way You Slice It-A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. *J Biomol Tech*. 2015;26:54-65.
- [140] Oreopoulos J, Berman R, Browne M. Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. *Methods Cell Biol*. 2014;123:153-75.
- [141] Hoover EE, Squier JA. Advances in multiphoton microscopy technology. *Nat Photonics*. 2013;7:93-101.
- [142] Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*. 2003;21:1369-77.
- [143] Williams RM, Zipfel WR, Webb WW. Multiphoton microscopy in biological research. *Curr Opin Chem Biol*. 2001;5:603-8.
- [144] Zengel P, Nguyen-Hoang A, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E.  $\mu$ -Slide Chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol*. 2011;12:21.
- [145] Baatout S, Cheta N. Matrigel: a useful tool to study endothelial differentiation. *Rom J Intern Med*. 1996;34:263-9.
- [146] Malinda KM. In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods Mol Biol*. 2009;467:287-94.
- [147] Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis*. 2002;5:75-80.
- [148] Coltrini D, Di Salle E, Ronca R, Belleri M, Testini C, Presta M. Matrigel plug assay: evaluation of the angiogenic response by reverse transcription-quantitative PCR. *Angiogenesis*. 2013;16:469-77.
- [149] Kragh M, Hjarnaa PJ, Bramm E, Kristjansen PE, Rygaard J, Binderup L. In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity. *Int J Oncol*. 2003;22:305-11.
- [150] Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, Kneser U, Mitchell G. To Matrigel or Not to Matrigel. *The American Journal of Pathology*. 2008;172:1441-2.
- [151] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:902-6.
- [152] Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol*. 1987;105:2535-41.

- [153] Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*. 1989;243:1483-5.
- [154] Yip HK, Sun CK, Tsai TH, Sheu JJ, Kao YH, Lin YC, et al. Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia. *Int J Cardiol*. 2013;168:226-36.
- [155] Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res*. 2001;61:5587-94.
- [156] Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, et al. PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:562481.
- [157] Prager GW, Mihaly J, Brunner PM, Koshelnick Y, Hoyer-Hansen G, Binder BR. Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Blood*. 2009;113:1383-90.
- [158] Welling TH, Huber TS, Messina LM, Stanley JC. Tissue plasminogen activator increases canine endothelial cell proliferation rate through a plasmin-independent, receptor-mediated mechanism. *J Surg Res*. 1996;66:36-42.
- [159] Roelofs JJ, Rouschop KM, Leemans JC, Claessen N, de Boer AM, Frederiks WM, et al. Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:131-40.
- [160] Lau CL, Zhao Y, Kim J, Kron IL, Sharma A, Yang Z, et al. Enhanced fibrinolysis protects against lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137:1241-8.
- [161] Sperandio M, Quackenbush EJ, Sushkova N, Altstatter J, Nussbaum C, Schmid S, et al. Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in mouse yolk sac vessels. *Blood*. 2013;121:e118-28.
- [162] Karenberg K, Hudalla H, Frommhold D. Leukocyte recruitment in preterm and term infants. *Mol Cell Pediatr*. 2016;3:35.
- [163] Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:378-86.
- [164] Jang YC, Tsou R, Gibran NS, Isik FF. Vitronectin deficiency is associated with increased wound fibrinolysis and decreased microvascular angiogenesis in mice. *Surgery*. 2000;127:696-704.
- [165] De Lorenzi V, Sarra Ferraris GM, Madsen JB, Lupia M, Andreasen PA, Sidenius N. Urokinase links plasminogen activation and cell adhesion by cleavage of the RGD motif in vitronectin. *EMBO Rep*. 2016;17:982-98.
- [166] Hillig T, Engelholm LH, Ingvarsen S, Madsen DH, Gardsvoll H, Larsen JK, et al. A composite role of vitronectin and urokinase in the modulation of cell morphology upon expression of the urokinase receptor. *J Biol Chem*. 2008;283:15217-23.

- [167] Yi M, Sakai T, Fassler R, Ruoslahti E. Antiangiogenic proteins require plasma fibronectin or vitronectin for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11435-8.
- [168] Wang L, Zhang X, Pang N, Xiao L, Li Y, Chen N, et al. Glycation of vitronectin inhibits VEGF-induced angiogenesis by uncoupling VEGF receptor-2- $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin cross-talk. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1796.
- [169] Jin YJ, Park I, Hong IK, Byun HJ, Choi J, Kim YM, et al. Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin  $\alpha$ (5) $\beta$ (1)/ $\alpha$ (v) $\beta$ (3)-dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal*. 2011;23:125-34.
- [170] Conconi MT, Ghezzi F, Dettin M, Urbani L, Grandi C, Guidolin D, et al. Effects on in vitro and in vivo angiogenesis induced by small peptides carrying adhesion sequences. *J Pept Sci*. 2010;16:349-57.
- [171] Kanse SM, Matz RL, Preissner KT, Peter K. Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the  $\beta$ 2 integrin Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2251-6.
- [172] Madsen CD, Sidenius N. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur J Cell Biol*. 2008;87:617-29.
- [173] Zaveri TD, Lewis JS, Dolgova NV, Clare-Salzler MJ, Keselowsky BG. Integrin-directed modulation of macrophage responses to biomaterials. *Biomaterials*. 2014;35:3504-15.
- [174] Hyde C, Hollier B, Anderson A, Harkin D, Upton Z. Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1198-206.
- [175] Scaffidi AK, Moodley YP, Weichselbaum M, Thompson PJ, Knight DA. Regulation of human lung fibroblast phenotype and function by vitronectin and vitronectin integrins. *J Cell Sci*. 2001;114:3507-16.
- [176] Salaszyk RM, Zappala M, Zheng M, Yu L, Wilkins-Port C, McKeown-Longo PJ. The uPA receptor and the somatomedin B region of vitronectin direct the localization of uPA to focal adhesions in microvessel endothelial cells. *Matrix Biol*. 2007;26:359-70.
- [177] Madsen CD, Ferraris GM, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol*. 2007;177:927-39.
- [178] Brown SL, Lundgren CH, Nordt T, Fujii S. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1815-20.
- [179] Kricker JA, Hyde CE, Van Lonkhuizen DR, Hollier BG, Shooter GK, Leavesley DI, et al. Mechanistic investigations into interactions between IGF-I and IGFBPs and their impact on facilitating cell migration on vitronectin. *Growth Factors*. 2010;28:359-69.

[180] Krickler JA, Towne CL, Firth SM, Herington AC, Upton Z. Structural and functional evidence for the interaction of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins with vitronectin. *Endocrinology*. 2003;144:2807-15.

[181] Upton Z, Cuttle L, Noble A, Kempf M, Topping G, Malda J, et al. Vitronectin: growth factor complexes hold potential as a wound therapy approach. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1535-44.

[182] Upton Z, Wallace HJ, Shooter GK, van Lonkhuyzen DR, Yeoh-Ellerton S, Rayment EA, et al. Human pilot studies reveal the potential of a vitronectin: growth factor complex as a treatment for chronic wounds. *Int Wound J*. 2011;8:522-32.

[183] Dawson RA, Upton Z, Malda J, Harkin DG. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor I in conjunction with insulin-like growth factor binding protein 5, epidermal growth factor, and vitronectin. *Transplantation*. 2006;81:1668-76.

## VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der Schritte der Leukozytenrekrutierung aus der postkapillären Venole ins entzündete Gewebe (modifiziert nach [30], siehe auch [32, 47-50]).....	10
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Prozesse beim endothelialen sprouting: A) Initiierung der Angiogenese und tip cell Formierung, B) Elongation des sprouts über stalk cells, Formierung des Lumens und Rekrutierung von Perizyten, C) Remodeling und Netzwerkkonsolidierung (modifiziert nach [59]).....	12
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der Interaktionen im fibrinolytischen System (modifiziert nach [48]).....	16
<b>Abbildung 4:</b> Konstruktionsskizze der Rückenhautkammer für Mäuse (angelehnt an [126]). .....	23
<b>Abbildung 5:</b> Maßstabgerechte schematische Darstellung einer Maus mit Rückenhautkammer. ....	23
<b>Abbildung 6:</b> Poröses Polyethylen Sheet mit einer Porengröße von etwa 100 – 250 µm. ...	26
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der Auswahl der intravitalmikroskopisch untersuchten ROIs, ROI I-V decken den Implantatbereich ab, wohingegen sich ROI VI – IX im Implantatlager befinden. ....	29
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues zur Messung der funktionellen Gewebsintegration. ....	32
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls. ....	36
<b>Abbildung 10:</b> Konfokalmikroskopische Darstellung der Verteilung von uPA, tPA und PAI-1 in Relation zum CD31-positiven Gefäßnetzwerk im PPE-Implantat (Maßstabsbalken 100 µm, trans = Transilluminationsdarstellung, merge = Überlagerungsdarstellung). ....	39
<b>Abbildung 11:</b> Zeitlicher Verlauf der Vaskularisation eines PPE-Implantates im WT-Versuchstier, repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen mittels FITC-Dextran als Plasmamarker, Tag 0 (A), Tag 7 (B), Tag 10 (C), Tag 14 (D), Prozentualer Anteil perfundierter Gefäße am Gesamtnetzwerk im PPE-Implantat im zeitlichen Verlauf im WT-Versuchstier (E) (MW±SEM für n=6, Maßstabsbalken 100 µm). ....	40
<b>Abbildung 12:</b> Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation in uPA <sup>-/-</sup> , tPA <sup>-/-</sup> und PAI-1 <sup>-/-</sup> Versuchstieren sowie WT-Tieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT-Kontrolle). ....	41
<b>Abbildung 13:</b> Mittlere Gefäßsegmentlänge (A), Anzahl der Gefäßsegmente (B) sowie Anzahl und Ordnung der Verzweigungspunkte (C-F) im Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation in WT, uPA <sup>-/-</sup> , tPA <sup>-/-</sup> , sowie PAI-1 <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT-Kontrolle). ....	43
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im neu gebildeten Gefäßnetzwerk eines PPE-Implantates im WT-Versuchstier, repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen mittels Rhodamin 6G als Leukozytenmarker (Maßstabsbalken 100 µm). ....	45
<b>Abbildung 15:</b> Anzahl der am Gefäßendothel rollenden (A) sowie fest adhärenen Leukozyten (B) in neu gebildeten Mikrogefäßen im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA <sup>-/-</sup> , tPA <sup>-/-</sup> , sowie PAI-1 <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT-Kontrolle). ....	45

<b>Abbildung 16:</b> Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation bei WT, uPA <sup>-/-</sup> , tPA <sup>-/-</sup> , sowie PAI-1 <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT-Kontrolle). .....	47
<b>Abbildung 17:</b> Kollagendeposition im Implantatmaterial im WT-Tier (A), repräsentative Multi-Photon-Mikroskopie-Aufnahme, (Maßstabsbalken 100 µm, rote Markierung: Poren des Implantates), Mittlere Signalintensität (B) an Tag 14 nach Implantation in uPA <sup>-/-</sup> , tPA <sup>-/-</sup> und PAI-1-defizienten Tieren sowie WT-Tieren (MW±SEM für n=4, *p<0,05 vs. WT-Kontrolle).....	48
<b>Abbildung 18:</b> Einfluss von rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 auf den FMI II migrierender Endothelzellen, gezeigt sind repräsentative Migrationsplots (A), sowie die kumulative Auswertung (MW±SEM für n=3, *p < 0,05 vs. +/-) (B), +/- stellt hierbei die Positivkontrolle mit gleichmäßiger Konzentration des chemotaktischen Stimulus im Migrationsmedium dar, -/- steht für die Negativkontrolle ohne chemotaktischen Stimulus im Migrationsmedium, wohingegen +/- einen kontinuierlichen Gradienten des jeweiligen chemotaktischen Stimulus repräsentiert. ....	48
<b>Abbildung 19:</b> Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte sowie Anzahl von Gefäßsegmenten (C) und Gefäßverzweigungspunkten (D) an Tag 7, 10 und 14 im Implantatmaterial nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. Matrigel). ....	50
<b>Abbildung 20:</b> Leukozytenrekrutierung im Implantatmaterial (A, B) sowie im Implantatlager (C, D) an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. Matrigel). ....	53
<b>Abbildung 21:</b> Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation von mittels DFP-uPA oder NE-tPA beschichteten PPE-Implantaten, prozentualer Zuwachs der absoluten (C) und funktionellen (D) Gefäßdichte bei Oberflächenbeschichtung mittels uPA, DFP-uPA, tPA, NE-tPA, sowie PAI-1 gegenüber eine alleinigen Beschichtung mit Matrigel an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation (MW±SEM für n=5, *p<0,05 vs Matrigel). ..	55
<b>Abbildung 22:</b> Repräsentative konfokalmikroskopische Darstellung der Deposition von VN im Implantatmaterial an Tag 3 (A), 7 (B), 10 (C) und 14 (D) nach Implantation, Mittlere Graustufenintensität an Tag 3, 7,10 und 14 nach Implantation (E; MW±SEM für n=3, Maßstabsbalken 100 µm). ....	60
<b>Abbildung 23:</b> Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates, prozentualer Anteil an perfundiertem Gefäßnetzwerk (C) in WT, sowie VN <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT). ....	61
<b>Abbildung 24:</b> Anzahl an Gefäßsegmenten (A) und Verzweigungspunkten (B-D) sowie durchschnittliche Segmentlänge im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial (E) an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT, sowie VN <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT). ....	62
<b>Abbildung 25:</b> Flussgeschwindigkeit (A) und mittlerer Gefäßdurchmesser (B) im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT sowie VN <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. WT). ....	63
<b>Abbildung 26:</b> Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatlager an Tag 14 nach Implantation in WT sowie VN <sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6) .....	65
<b>Abbildung 27:</b> Absolute (A) und funktionelle (B) Gefäßdichte, prozentualer Anteil des perfundierten Gefäßnetzwerkes (C), mittlere Gefäßdurchmesser (D) sowie Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten (E, F) im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 Tage nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6, *p<0,05 vs. Matrigel). ....	66

**Abbildung 28:** Flussgeschwindigkeit im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel). .....67

**Abbildung 29:** Desintegrationskraft bei mechanischer Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation (MW±SEM für n=6, \*p<0,05 vs. Matrigel). .....70

**Abbildung 30:** Schematische Ergebniszusammenfassung: Bedeutung von uPA, tPA und PAI-1 sowie VN für die funktionelle Biontegration von PPE-Implantaten hinsichtlich vaskulärer Gewebsintegration, struktureller Gewebsintegration und Leukozytenrekrutierung. ....92

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Ausgewählte, im Kontext von Inflammation, Angiogenese und Wundheilung relevante Interaktionspartner von VN (modifiziert nach [114])..... 18

**Tabelle 2:** Mittlere Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6). .....42

**Tabelle 3:** Mittlere Gefäßdichte, mittlerer Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit im umgebenden Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6). .....44

**Tabelle 4:** Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation in WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI-1<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6). .....46

**Tabelle 5:** Systemische Leukozytenzahl bei Versuchsende bei WT, uPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, sowie PAI<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW+/-SEM für n=6). .....46

**Tabelle 6:** Mittlere Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit und Gefäßsegmentlängen im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6). .....51

**Tabelle 7:** Mittlerer Gefäßdurchmesser, Gefäßdichte und Blutflussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6). .....52

**Tabelle 8:** Systemische Leukozytenzahl bei Versuchsende an Tag 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6). .....54

**Tabelle 9:** Desintegrationskraft zur Luxation des Implantates aus dem Implantatbett an Tag 14 nach Implantation von PPE mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung mittels rekombinantem uPA, tPA oder PAI-1 (MW±SEM für n=6). .....54

**Tabelle 10:** Mikrovaskuläre Parameter der Mikrozirkulation sowie Leukozyten-Endothelzellinteraktionen in Implantat und Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + DFP-uPA oder tPA (NE), systemische Leukozytenzahl und mechanische Gewebsintegration des Implantates an Tag 14 nach PPE-Implantation mit Oberflächenbeschichtung mit Matrigel, sowie Matrigel + DFP-uPA oder tPA (NE) (MW±SEM für n=5). .....56

**Tabelle 11:** Mittlere Gefäßdurchmesser, mittlere Gefäßdichte und Flussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines PPE-Implantates in WT sowie VN<sup>-/-</sup> Versuchstieren (MW±SEM für n=6). .....63

---

<b>Tabelle 12:</b> Anzahl an rollenden sowie fest adhärennten Leukozyten im neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantat sowie im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach PPE Implantation in WT sowie $VN^{-/-}$ Versuchstieren (MW $\pm$ SEM für n=6).....	64
<b>Tabelle 13:</b> Mittlere Gefäßsegmentlängen in neugebildeten Gefäßnetzwerk im Implantatmaterial an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW $\pm$ SEM für n=6).....	67
<b>Tabelle 14:</b> Mittlere Gefäßdurchmesser, mittlere Gefäßdichte und Flussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation im Implantatlager an Tag 7, 10 und 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW $\pm$ SEM für n=6).....	68
<b>Tabelle 15:</b> Anzahl an rollenden sowie fest adhärennten Leukozyten im Implantat sowie im Implantatlager an Tag 7, 10 sowie 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN oberflächenbeschichteten PPE-Implantates, Systemische Leukozytenzahl an Tag 14 nach Implantation eines mit Matrigel oder Matrigel + VN-oberflächenbeschichteten PPE-Implantates (MW $\pm$ SEM für n=6).....	69

## VII. Abkürzungsverzeichnis

### **ANG/TIE**

Angiopoetin / Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains

### **bFGF**

basic Fibroblast Growth Factor

### **BSA**

Bovine Serum Albumin

### **CD-31**

Cluster of Differentiation 31, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1)

### **DFP**

Diisopropylfluorophosphat

### **ECBM**

Endothelial Cell Basal Medium

### **ECGM**

Endothelial Cell Growth Medium

### **EGF**

Epithelial Growth Factor

### **FGF**

Fibroblast Growth Factor

### **FMI**

Forward Migration Index

### **HUVECs**

Human Umbilical Vein Endothelial Cells

### **MALP-2**

Macrophage Activating Lipopeptide 2

### **MMPs**

Matrix-Metalloproteinasen

### **MW**

Arithmetischer Mittelwert

### **NE**

Non-Enzymatic

### **PAI-I**

Plasminogen Activator Inhibitor 1

### **PBS**

Phosphate Buffered Saline

### **PDGF**

Platelet Derived Growth Factor

### **PPE**

Poröses Polyethylen

### **SEM**

Standard Error of the Means (Standardfehler)

### **tPA**

tissue Plasminogen Activator

### **TGF beta**

Transforming Growth Factor beta

### **uPA**

urokinase type Plasminogen Activator

### **VEGF**

Vascular Endothelial Growth Factor

### **VN**

Vitronektin

### **WT**

Wildtyp

## VIII. Publikationen

### Originalarbeiten

Reichel CA\*, **Hessenauer M** \*, Pflieger K, Rehberg M, Kanse SM, Zahler S, Krombach F, Berghaus A, Strieth S: Components of the Plasminogen Activation System Promote Engraftment of Porous Polyethylene Biomaterial via Common and Distinct Effects. PLoS ONE 10(2): e0116883

*Reichel CA und Hessenauer M trugen im gleichen Umfang zu dieser Studie bei. Hessenauer M konzipierte und plante die Experimente, führte die Experimente durch, analysierte die Ergebnisse und verfasste die Publikation.*

(siehe auch: Acknowledgements & Author Contributions in der Originalarbeit)

**Hessenauer M**, Lauber K, Zuchtriegel G, Uhl B, Hussain T, Canis M, Strieth S, Berghaus A, Reichel CA: Vitronectin promotes the vascularization of porous polyethylene biomaterial, *Acta Biomaterialia*, manuscript under revision

Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, **Hessenauer M**, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, Zahler S, Krombach F, Reichel C: Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Jul;34(7):1495-504

Zuchtriegel G, Uhl B, **Hessenauer M**, Kurz AR, Rehberg M, Lauber K, Krombach F, Reichel C: Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Apr;35(4):899-910

### **Vorträge und Posterpräsentationen**

**Hessenauer M**, Reichel C, Rehberg M, Berghaus A, Strieth S

Components of the Plasminogen Activation System Differentially Promote Biointegration of Porous Polyethylene Implants *in vivo*

Posterpräsentation, International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan (2014)

**Hessenauer M**, Reichel C, Rehberg M, Berghaus A, Strieth S

Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 promote tissue integration of biomaterial

Vortrag, Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Albufeira, Portugal (2013)

*EFIS Travel Grant for European Society for Clinical Investigation Meeting 2013, Albufeira, Portugal*

**Hessenauer M**, Reichel C, Rehberg M, Berghaus A, Strieth S

Role of tPA and PAI-1 for tissue integration of PPE biomaterial

Posterpräsentation, International Union of Physiological Sciences Meeting, Birmingham, UK (2013)

*Poster Prize of the European Society for Microcirculation and the European Vascular Biology Organization, IUPS Birmingham 2013*

**Hessenauer M**

Components of the Plasminogen Activation System differentially promote Biointegration of Porous Polyethylene biomaterial

Vortrag, SFB 914 IRTG Retreat, Villa Vigoni, Italien (2013)

**Hessenauer M**, Reichel C, Rehberg M, Berghaus A, Strieth S

Role of tPA and PAI-1 for tissue integration of PPE biomaterial

Posterpräsentation, SFB 914 Retreat, Obergurgl, Österreich (2013)

**Hessenauer M**

The role of the Plasminogen Activation System for the Biointegration of Porous Polyethylene Implants

Vortrag, Doktorandentag Klinikum Großhadern, München (2013)

**Hessenauer M**

The role of the Plasminogen Activation System for the Biointegration of Porous Polyethylene Implants

Vortrag, SFB 914 IRTG Retreat, San Servolo, Italien (2012)

**Hessenauer M, Reichel C, Berghaus A, Strieth S**

Role of tPA and PAI-1 for tissue integration of PPE biomaterial

Posterpräsentation, Joint Meeting Society of Vascular Biology and Microcirculation, Dutch Society for Endothelial Biology, Mannheim (2012)

**Hessenauer M**

Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivierung-Systems für die Biointegration von Porösen Polyethylenimplantaten

Vortrag, Kongress des Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU, Herrsching (2012)

## IX. Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die überaus freundliche und herzliche Aufnahme in das Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, wodurch diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sebastian Strieth, Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus sowie Herrn Prof. Dr. Martin Canis für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themenkomplexes sowie den Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten bedanken. Ihrer stets wohlwollenden Förderung ist der Erfolg meines Promotionsprojektes zu verdanken. Die Arbeit im Themenbereich Biomaterialien, *tissue engineering* und Immunologie hat meinen Erfahrungshorizont bereichert und meine weitere medizinische Laufbahn maßgeblich beeinflusst.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Christoph Reichel, der mich über den gesamten Verlauf meines Promotionsprojektes mit großem Engagement, wissenschaftlicher Begeisterung, Interesse sowie unter enormem persönlichem Einsatz betreute. Mit großer Geduld und in immer freundschaftlicher Unterstützung begleitete er meine ersten wissenschaftlichen Schritte, führte mich in experimentelle Methodik und Versuchsplanung ein, lehrte mich die praktische Durchführung von Versuchen, die Auswertung derselben sowie die Interpretation und Darstellung der Versuchsergebnisse und bereitete mich mit Hingabe und Akribie auf die Präsentation und Diskussion der Ergebnisse im akademischen Rahmen vor. Seine immerwährende Begeisterung, seine beeindruckende Fachkenntnis, die zahlreichen lebhaften Diskussionen und die stets konstruktiven Ratschläge waren in jeder Phase von entscheidender Bedeutung für mein Projekt. Zudem konnte sich unter seiner Führung ein wirklich einmaliges Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe herausbilden, in dem alle Arbeitsgruppenmitglieder mit Freude, Begeisterung, aufrichtiger persönlicher Wertschätzung und in Freundschaft zusammenarbeiten konnten. Diese hervorragende Betreuung war nicht nur ausschlaggebend für den Erfolg meines Promotionsprojektes, sondern hat meinen Werdegang in wissenschaftlicher, klinischer und persönlicher Hinsicht entscheidend geprägt.

Ebenfalls besonderer Dank gilt dem Vorstand sowie allen Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches (SFB) 914 *Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease*, allen voran Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach sowie Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio für die stets großzügige Unterstützung meines Projektes, das überaus befruchtende Arbeitsumfeld sowie die zahlreichen lehrreichen Diskussionen. Durch die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg *Integrated Research Training Group* sowie die damit verbundenen Fördermaßnahmen und Seminare wurde meine Arbeit in entscheidenden Phasen maßgeblich beeinflusst und diese Förderung trug in umfassendem Maßstab zum Erfolg meiner Arbeit bei.

Von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Herrn Dr. Bernd Uhl, Frau Dr. Gabriele Zuchriegel, Herrn Daniel Puhr-Westerheide, Herrn Matthias Fabritius, Frau Michaela Pörnbacher, Frau Dr. Stefanie Hirn, Frau Katharina Nekolla, Frau Sabine Sellner, Herrn Kariem Sharaf, Herrn Timon Hussain, Frau Ursula Schmidtmayer, Herrn Jan Gayer sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Rehberg. In diesem überaus befruchtenden Arbeitsumfeld konnten sich Freundschaften, die weit über die selbstverständliche Kollegialität hinausgingen, entwickeln, die die Zeit am Walter-Brendel-Zentrum für mich immer zu einer besonderen Erinnerung machen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Stefan Zahler von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie seiner gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Kooperation danken, ohne die viele der durchgeführten Experimente in dieser Form nicht möglich gewesen wären.

Zudem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie ihrer Arbeitsgruppe, ebenfalls für eine wohlwollende und hilfreiche Kooperation.

Zu ausdrücklichen Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Sandip Kanse vom Institut for Basic Medical Sciences der Universität Oslo für die freundliche Überlassung der uPA-defizienten Versuchstiere.

Mein Dank gebührt auch allen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern im Institut, den technischen Assistenten sowie den Tierpflegern, die alle gemeinsam zu einer außergewöhnlichen Arbeitsatmosphäre beitrugen und mir somit Freude und Spaß an der Wissenschaft vermittelten. Ohne sie wäre mein Dissertationsprojekt nicht in dieser Form möglich gewesen.

Des Weiteren dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Klaus Ley vom La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, USA für ein überaus aufschlussreiches, lehrreiches und persönliches Gespräch ganz zu Beginn meines Dissertationsvorhabens, das mich nachhaltig beeinflusst und beeindruckt hat.

Herrn Prof. Dr. Friedhelm Hoffmann vom Institut für Ägyptologie und Koptologie der Ludwig-Maximilians-Universität München als mein Vertrauensdozent der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich ausdrücklich für die zahlreichen persönlichen Gespräche über den gesamten Verlauf meines Studiums und Promotionsprojektes danken, die mir oft dabei halfen, einen weiten Blick zu wahren, einen Schritt zurück zu treten und Probleme von einer anderen Seite zu betrachten.

Zutiefst dankbar bin ich meinen Eltern sowie meiner gesamten Familie für die immerwährende wohlwollende Unterstützung und Förderung, auf die ich mich während meiner Kindheit, meiner Schulzeit, meines gesamten Studiums sowie während meines Dissertationsprojektes immer bedenkenlos und uneingeschränkt verlassen konnte.

Zudem schulde ich meinen Dank all meinen Freunden für die kontinuierliche Unterstützung, das große Verständnis und das ehrliche Interesse an meiner Arbeit und meiner Person.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank zudem Frau Angelika Eichholz für die stets wohlwollende, verständnisvolle und liebevolle Unterstützung bei all meinen beruflichen und privaten Vorhaben.