



Technische Universität München

**Fakultät für Medizin**

**Lehrstuhl für Plastische Chirurgie und Handchirurgie**

**(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens)**

**Einfluss der extrazellulären Matrix auf den parakrinen Effekt hypoxisch präkonditionierter Blutzellen bei der Sprouting-Angiogenese**

**Philipp Moog**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. A.-F. Schilling
2. Prof. Dr. H.-G. Machens

Die Dissertation wurde am 02.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2017 angenommen.

Betreuender Hochschullehrer: Univ.-Prof. Dr. med. A.F. Schilling  
Mitbetreuender Akademiker: PD Dr. H. Hadjipanayi, MD PhD

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>7</b>
<b>II. EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
A. Angiogenese .....	10
A.1. Allgemein.....	10
A.2. Sprouting-Angiogenese .....	11
A.3. Non-Sprouting-Angiogenese .....	12
A.4. Vorkommen der Angiogenese .....	13
B. Angiogenese in der Wundheilung .....	14
B.1. Physiologische Wundheilung .....	14
B.1.a. Phase der Hämostase .....	15
B.1.b. Phase der Inflammation .....	18
B.1.c. Phase der Proliferation .....	19
B.1.d. Phase des Remodelings.....	20
B.2. Pathologische Wundheilung.....	21
<b>III. HYPOTHESEN.....</b>	<b>24</b>
A. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss von der extrazellulären Matrix.....	24
<b>IV. MATERIAL/ METHODEN .....</b>	<b>25</b>
A. Aortic Ring Assay (ARA).....	25
A.1. Chirurgische Entnahme der Mauseorta.....	25
A.2. Präparation der Mauseorta.....	26
A.3. Kultivierung der Mauseorta in Matrigel.....	27
A.4. Mediumwechsel.....	28

B. Herstellung der extrazellulären Matrix .....	29
B.1. Herstellung des Collagen-Gels.....	29
B.2. Herstellung des Fibrin-Gels.....	29
C. Herstellung der Untersuchungsgruppen .....	30
C.1. Negativ-Kontrolle: AIM .....	30
C.2. Positiv-Kontrolle: VEGF .....	30
C.3. Collagen-Gel-Releasate .....	30
C.4. Fibrin-Gel-Releasate .....	32
C.5. Serum.....	33
C.6. Cultured-Clot-Releasate.....	33
D. Quantitative Proteinbestimmung.....	34
D.1. ELISA: VEGF .....	34
D.2. ELISA: PF-4 .....	35
E. Auswertung .....	35
E.1. Mikroskopische-Quantifizierung der Sprouting-Anzahl .....	35
E.2. Quantifizierung der Sprouting-Länge .....	37
E.3. Übersicht der Auswertungen jeder Untersuchungsgruppe.....	37
F. Statistik.....	39
<b>V. ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
A.1. Angiogenes Potential parakriner Proteine, gewonnen aus hypoxisch prä-konditionierten peripheren Blutzellen. ....	40
A.2. Der Einfluss von VEGF auf die Sprouting-Angiogenese.....	42
A.3. Der Einfluss der extrazellulären Matrix (Collagen-Gel, Fibrin-Gel) auf die Sprouting-Angiogenese, nach Speicherung und Freisetzung parakriner Proteine. ...	45
A.4. Der Einfluss einer erhöhten Konzentration von PF-4 auf die Sprouting-Angiogenese. ....	49

A.5. Die extrazelluläre Matrix Fibrin nimmt Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese.51

A.6. Die Fähigkeit der extrazellulären Matrix Fibrin parakrine Proteine zu binden.... 58

**VI. DISKUSSION..... 60**

A. Diskussion von Material und Methoden ..... 60

B. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss der extrazellulären Matrix. .... 64

B.1. Aus peripheren Blutzellen gewonnene parakrine Proteine induzieren nach Freisetzung aus der extrazellulären Matrix (Collagen-Gel) stärkere Sprouting-Angiogenese als die Positiv-Kontrolle VEGF..... 64

B.2. Die Sprouting-Anregung durch parakrine Proteine wird zum Teil durch VEGF vermittelt. .... 67

B.3. Das Releasate von parakrinen Proteinen aus der extrazellulären Matrix Collagen-Gel zeigt signifikant bessere Sprouting-Angiogenese als das Releasate aus der extrazellulären Matrix Fibrin-Gel. .... 71

B.4. Eine erhöhte Konzentration von PF-4 hat einen anti-angiogenen Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese. .... 73

B.5. Die biophysikalische Regulation durch die extrazelluläre Matrix auf die Zusammensetzung der parakrinen Proteine und dessen Auswirkung auf die Sprouting-Angiogenese. .... 78

C. Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf mögliche Therapieansätze zur verbesserten Behandlung chronischer Wunden. ....	86
C.1. Aktuelle Wundbehandlungsstrategien .....	86
C.2. Angiogenese als Therapieansatz .....	90
C.2.a. Angiogenese durch zellfreie pharmakologische Therapie .....	91
C.2.b. Angiogenese basierend auf prä-Konditionierung von Zellen .....	91
C.2.c. Angiogenese durch zellfreie Gen-Therapie .....	92
C.2.d. Angiogenese basierend auf Gen-Therapie.....	92
C.2.e. Angiogenese basierend auf zellfreier prä-Konditionierung.....	93
C.3. Therapieansatz: Angiogenese basierend auf hypoxisch prä-konditionierten Blutzellen (EmaCure) .....	93
<b>VII. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>102</b>
A. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss der extrazellulären Matrix. ....	103
B. Biophysikalische Regulation durch die extrazelluläre Matrix auf die Zusammensetzung der parakrinen Proteine und deren Auswirkung auf die Sprouting-Angiogenese. ....	105
<b>VIII. DANKSAGUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>IX. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>108</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

- \*: statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ )
- + ab/am: plus Antibiotikum/ Antimykotikum
- $\mu\text{g}$ : Mikrogramm
- $\mu\text{l}$ : Mikroliter
- Abb.: Abbildung
- ANG: Angiogenin
- ARA: Aortic Ring Assay
- ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
- BMI: Body-Mass-Index
- BMSC: bone marrow derived mesenchymal stromal cells
- $\text{CoCl}_2$ : Kobalt-Chlorid
- DFO: Deferoxamin
- ECM: Extracellular matrix (=extrazelluläre Matrix)
- EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure (Chelatbildner)
- EGF: epidermal growth factor receptor
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- EPC-CM: Endotheliale Vorläuferzellen
- EPO: Erythropoietin
- FGF: fibroblast growth factor
- FIH: factor inhibiting HIF
- g=: Erdbeschleunigung (ca.  $9.81 \text{ m/s}^2$ )
- HIF-1-alpha: Hypoxie-induzierter Faktor-1-alpha
- HPP: Hypoxie prä-konditioniertes Plasma
- HPS: Hypoxie prä-konditioniertes Serum
- HypPP: Hypoxie prä-konditionierte Produkte
- Hrs: hours (= Stunden)
- HUVEC: **human umbilical vein endothelial cells**
- IL-8: Interleukin-8

## I. Abkürzungsverzeichnis

---

- M: Molar
- mg: Milligramm
- min: Minuten
- ml: Milliliter
- mmHG: Millimeter Quecksilbersäule
- MMP: Matrix-metalloproteinase
- MT-MMPs: Membran-Typ MMPs
- NaOH: Natriumhydroxid
- neg.: negativ
- ng: nanogramm
- O<sub>2</sub>: Sauerstoff
- p: Signifikanzwert
- PAF: Plättchen-aktivierender Faktor
- pAVK: peripher arterielle Verschlusskrankheit
- PBMNC: peripheral blood mononuclear cells (=mononukleäre Blutzellen)
- PDAF: platelet-derived angiogenesis factor
- PDGF: platelet-derived growth factor
- PF-4: platelet factor-4
- pg: picogramm
- PHD: prolyl hydroxylase domain proteins
- PIGF: phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class
- PLGF: placental growth factor
- PMZ: periphere mononukleäre (Blut-) zellen
- pos.: positiv
- PRP: platelet rich plasma
- PRFM: platelet rich fibrin matrix
- Rpm: rotation per minute
- SF-Medium: serum-free-medium
- SST: serum separating tube
- TGF: transforming growth factor

- TIMP: tissue inhibitors of MMPs
- VEGF: vascular endothelial growth factor
- vHL: von Hippel-Lindau-Protein
- vWF: von Willebrand-Faktor
- z.B.: zum Beispiel
- $\alpha$ : alpha

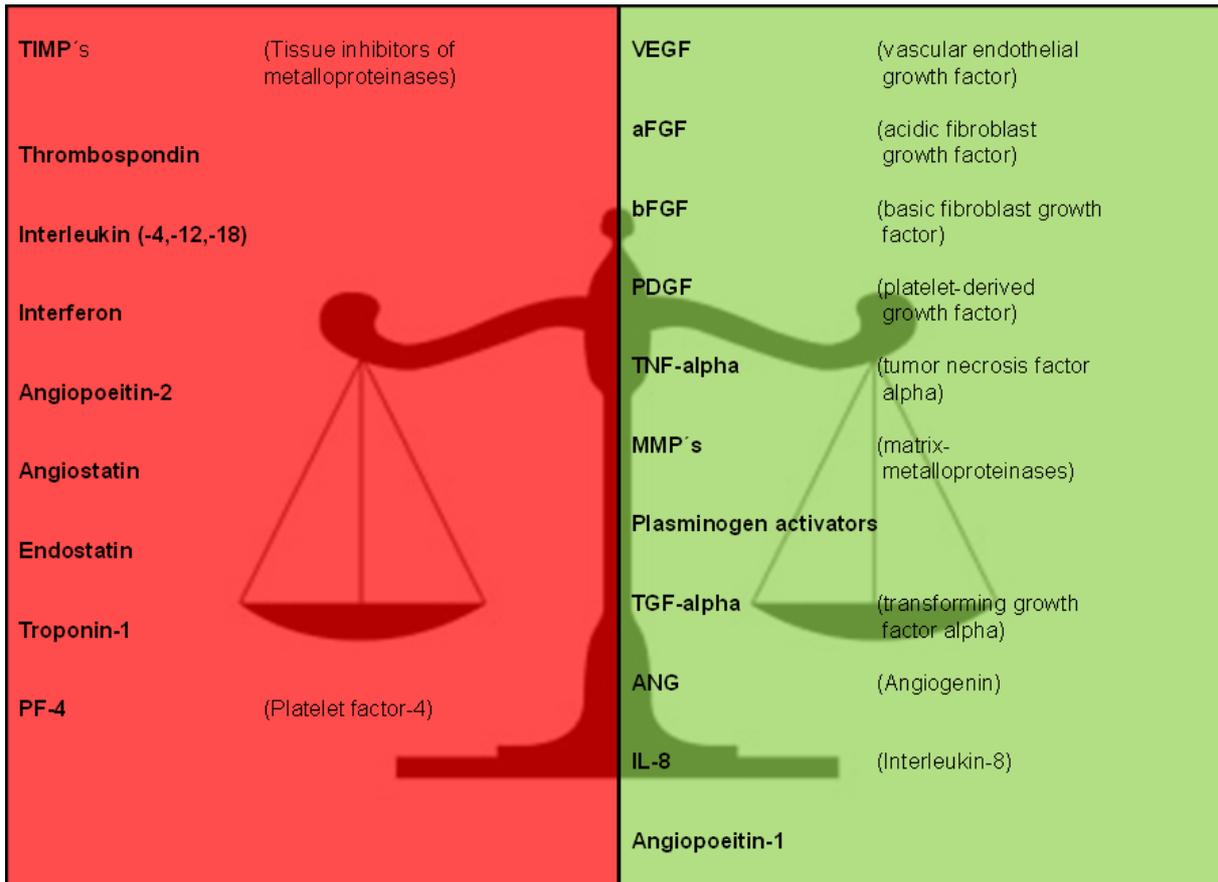
## II. Einleitung

### A. Angiogenese

#### A.1. Allgemein

Angiogenese, ist das Wachstum von neuen Blutgefäßen aus bereits vorhandenen Gefäßen [1]. Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen, welche als Vaskulogenese bezeichnet wird [2]. Gefäße sind Transportstraßen im menschlichen Körper. Sie versorgen die Zellen mit Nährstoffen und transportieren Sauerstoff und Stoffwechselprodukte an und ab [3]. Die angiogene Kaskade ist ein hoch komplexer Prozess, der eine große Bandbreite von Zelltypen und Signalwegen beinhaltet [4, 5]. In angiogenen Prozessen halten sich pro-angiogene und anti-angiogene Faktoren die Waage (s. Abb. 1.) [6-8]. Ein Ungleichgewicht kann zu pathologischen Erscheinungen führen [9]. Mittlerweile ist eine nicht mehr überschaubare Anzahl an angiogenen Proteinen bekannt. In Abbildung 1. sind bekannte pro- und anti-angiogene Faktoren aus der Literatur zusammengestellt [10].

Es sind zwei Formen der Angiogenese bekannt [1, 11]. Zum einen das Sprouting und zum anderen das Non-Sprouting oder auch Intussusception genannt [1, 12]. Welche der beiden gleichzeitig stattfindenden Angiogeneseformen während der Entwicklung von Geweben vorwiegend anzutreffen ist, hängt mutmaßlich von der Anzahl bereits vorhandener Gefäße im entsprechenden Gewebe ab [1]. Eine komplexe Wechselwirkung zwischen Zellen, löslichen Faktoren und der extrazellulären Matrix bildet die Voraussetzung für den koordinierten Ablauf der Angiogenese [13]. Dieser koordinierte Ablauf der Angiogenese umfasst vier unterschiedliche Phasen: 1. Abbau der extrazellulären Matrix (ECM); 2. Zell-Migration; 3. Zell-Proliferation; 4. Strukturelle Reorganisation [14]. Die strukturelle Reorganisation ist am ehesten der Non-Sprouting-Angiogenese in der Phase des Remodelings zuzuordnen.



**Abb. 1.:** Anti-(rot) und pro-(grün) angiogene Faktoren [10]

### A.2. Sprouting-Angiogenese

Das Sprouting (=Mikrogefäß-Aussprossung) ist die erste identifizierte Form der Angiogenese und beschreibt das Aussprossen von Kapillaren aus schon bestehenden Gefäßstrukturen [1]. Die erste Beschreibung dieser Angiogeneseform stammt aus dem Jahr 1977 von Ausprung und Folkman [12, 15]. Diese Form der Angiogenese überwiegt in der Wundheilungsphase der Proliferation. Es handelt sich um einen Prozess, der initiiert wird, wenn die Zellen hypoxischem Stress ausgesetzt sind [11]. Dieser Prozess beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Phasen: Neovessel-Wachstum gefolgt von Neovessel-Stabilisierung [11]. Der hypoxische Reiz bewirkt einen angiogenen Stimulus [16, 17]. Dieser Stimulus leitet die einzelnen Schritte der Sprouting-Angiogenese ein. Diese Schritte umfassen den enzymatischen Abbau der extrazellulären Membran durch z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) [1]. Zudem

beinhaltet er die Endothelzell-Proliferation, die sich durch den Abbau der extrazellulären Membran nach außen, entlang der Wachstumsfaktor-Konzentration, ausweiten kann [1]. Der Endothel-Proliferation in die Peripherie schließt sich eine Reifung der ausgesprossenen Gefäße in Form einer Lumenbildung, ebenso wie eine Reifung des Endotheliums an [1]. Vereinfacht ausgedrückt ist Sprouting-Angiogenese also ein Wachstum von Blutgefäßen über die Grenze der extrazellulären Membran, des bereits vorhandenen Gefäßes, hinaus [11].

### **A.3. Non-Sprouting-Angiogenese**

Dieser Begriff beinhaltet einen Prozess, der anders als bei der Sprouting-Angiogenese, schon bestehende Gefäße durch Einschnürung oder Kompartimentierung durch luminale Pillar (= Pfeiler) trennt [18]. Beschrieben wurde dieser Mechanismus von Patan et al. erstmals in einer embryonalen Lunge [19]. Durch diesen Mechanismus entsteht eine Vergrößerung des Kapillarnetzes durch Reorganisation der bestehenden Kapillaren [20]. Das bringt einige Vorteile mit sich wie z.B.: 1. eine höhere Geschwindigkeit der Vernetzung [20]; 2. eine erhöhte metabolische Effektivität [20]; 3. keine Notwendigkeit einer zusätzlichen Invasion des umliegenden Gewebes durch Sprouting-Angiogenese [20]. In der Literatur sind vier Phasen für diesen Mechanismus beschrieben: In der ersten Phase ist ein direkter Zell-zu-Zell-Kontakt der sich gegenüberliegenden Kapillarwände notwendig [20]. Möglich wird dieser Kontakt durch das Prolabieren der Gefäßwände in das Gefäßlumen [20]. Durch diesen Zellkontakt der prolabierten Gefäßwände wird in der zweiten Phase eine Umstrukturierung der Endothelzellverbindungen möglich [20]. Diese Umstrukturierung geht mit einer Perforation der Gefäßdoppelschicht einher, um Wachstumsfaktoren und Zellen die Möglichkeit zu bieten, in das Lumen einzudringen [20]. In der dritten Phase füllt sich die Kontaktzone mit Perizyten und Myofibroblasten, die damit beginnen, Collagen zu synthetisieren, welches für den Aufbau der neuen extrazellulären Matrix, also der neuen Gefäßwand benötigt wird [20]. Im abschließenden vierten Schritt wird die neue Gefäßwand so weit umgebaut, dass sie sich nicht mehr von anderen

Gefäßwänden unterscheidet [20]. Bis eine normale Gefäßdicke erreicht ist, kann dieser Prozess jedoch Jahre andauern.

### **A.4. Vorkommen der Angiogenese**

Angiogenese ist von großer Bedeutung für viele biologische und medizinische Abläufe. Sie ist bereits zu Beginn eines jeden Lebens, während der Embryogenese und der Schwangerschaft essentiell [9]. Durch die Bildung neuer Gefäße können die wachsenden Organe mit dem für das Wachstum notwendigen Sauerstoff versorgt werden [9]. Angiogenese kommt neben der Embryogenese auch physiologisch im adulten Organismus, z.B. in den weiblichen Reproduktionsorganen vor [21].

Weil dieser Prozess so essentiell für die Entstehung eines Lebens ist, können bei Dysregulation oder Störung der angiogenen Vorgänge viele Krankheiten entstehen. Ursächlich ist meist, wenn das Gleichgewicht der angiogenen Faktoren gestört wird [9]. Für mehr als 70 Erkrankungen ist eine pathologische Angiogenese als Grund beschrieben [9]. Die Liste wächst durch den Fortschritt in der medizinischen Forschung kontinuierlich an [9]. So ist bekannt, dass ein solches Ungleichgewicht zu bösartigen Malignomen, zu Augen- und Entzündungserkrankungen führen kann [9]. Die Angiogenese initiiert dabei zumeist nicht die Malignität, sondern fördert die Progression und Metastasierung der Malignome [9]. Schon im Jahr 1971 veröffentlichte Judah Folkman die Hypothese, dass Angiogenese verantwortlich für Tumorwachstum ist [22]. Die Hypothese beinhaltete damals ebenso, dass ein weiteres Tumorwachstum ab einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> ohne Angiogenese nicht möglich wäre [22]. Die Hypothese gilt heute als anerkannt [22]. Er erkannte zu jener Zeit schon das Potential für Therapiemöglichkeiten [22]. Außerdem spielt eine inadäquate Angiogenese bei vielen anderen Krankheitsbildern eine wesentliche Rolle, wie z.B. bei Adipositas, Asthma bronchiale, Diabetes mellitus, Leberzirrhose, multipler Sklerose, Endometriose, AIDS, bakterielle Infektionen und Autoimmunkrankheiten [9]. Entsprechend tritt die Angiogenese auch immer mehr in den Fokus für unterschiedliche Therapieansätze z.B. in der Onkologie oder Ophthalmologie [9, 23-

27]. Man unterscheidet dort zwischen zwei Formen der therapeutischen Anwendung: 1. Anti-angiogene-Therapie; 2. Pro-angiogene-Therapie.

Bei anderen Erkrankungen, wie bei einem ischämischen Myokardinfarkt, chronischen Wunden oder bei der Präeklampsie, ist die angiogene Adaptation nicht ausreichend, führt zu Fehlbildungen und verhindert aus diesem Grund eine ausreichende Revaskularisierung und somit eine Regeneration [9].

### **B. Angiogenese in der Wundheilung**

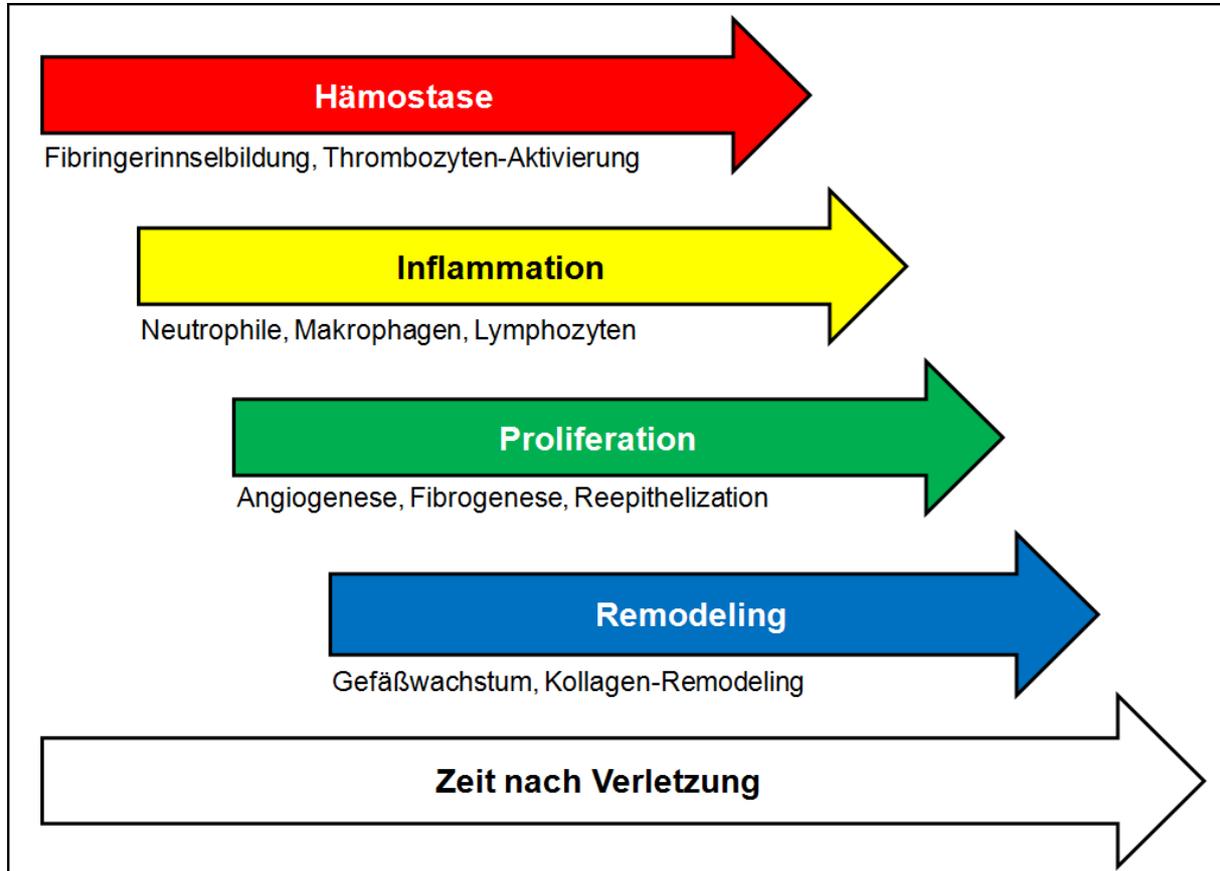
Neben pathologischen Vorgängen ist die Angiogenese besonders wichtig für die Reparatur und Regeneration im Rahmen der physiologischen Wundheilung. Wunden sind durch die Entwicklung eines extrem vaskularisierten Granulationsgewebes gekennzeichnet, um den hohen Sauerstoffbedarf und Nährstoffbedarf der schnell proliferierenden und migrierenden Fibroblasten und Keratinozyten decken zu können [28-30]. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die Angiogenese des Wundgebietes eine Schlüsselfunktion im Wundheilungsprozess einnimmt und die Förderung der Angiogenese die Wundheilung beschleunigt [31]. Durch die Gefäßverletzungen würde es ohne die Initiierung der Angiogenese zum dauerhaften Fehlen von Sauerstoff, Nährstoffen sowie den wichtigen Entzündungszellen in der Wunde kommen. Eine Heilung wäre unmöglich. Überlegt man sich, wie oft es im Laufe eines Lebens zu kleineren und größeren Verletzungen kommt wird einem bewusst wie wichtig die angiogenen Prozesse sind.

#### **B.1. Physiologische Wundheilung**

*(Textteile bereits zur Veröffentlichung eingereicht [32])*

Eine Wunde ist gekennzeichnet als eine Störung der anatomischen Gewebestruktur und Funktion [33], welche nach Ablauf der definierten Stadien der Wundheilung regeneriert werden kann [33]. Die Wundheilung ist ein biologischer Vorgang, bei dem durch Bindegewebsbildung, Kontraktion und Epithelisierung ein Verschluss des Integuments erfolgt [34]. So durchläuft eine physiologische Wundheilung mehrere sich

überlappende Phasen (s. Abb. 2.): 1. Hämostase; 2. Inflammation; 3. Proliferation; 4. Remodeling [10].



**Abb. 2.:** Stadien der Wundheilung (abgewandelt aus Gosain et al. 2004 [10])

Diese Phasen und ihre biophysiologicalen Funktionen müssen in richtiger Reihenfolge, zu einem bestimmten Zeitpunkt, für eine bestimmte Zeitdauer bei einer zweckmäßigen Intensität durchlebt werden [33, 35, 36].

### B.1.a. Phase der Hämostase

Eine sofortige Reaktion auf eine Verletzung erfolgt durch die primäre Hämostase (durch Aggregation von Thrombozyten) und durch die sekundäre Hämostase, (Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin), die Blutgerinnung [37]. Die primäre Hämostase der Blutstillung beginnt mit einer Vasokonstriktion [37]. In dieser Phase

sind die Thrombozyten entscheidend beteiligt. Thrombozyten exponieren in ihrer Plasmamembran mehrere Rezeptorproteine, durch die sie Defekte im Endothel der Blutgefäße detektieren können [37]. Die Rezeptorproteine binden spezifisch an Komponenten der extrazellulären Matrix, die im unverletzten Zustand von den Endothelzellen überdeckt sind [37]. Die wichtigste Komponente, die eine Bindung (Adhäsion) von Thrombozyten auslösen kann, scheint das Collagen zu sein, das sich unterhalb der Basalmembran in der subendothelialen Schicht befindet [37]. Sobald Collagen durch eine Verletzung des Endothels freigelegt wird, wird es unmittelbar vom von-Willebrand-Faktor (vWF) markiert [37]. Der vWF ist ein lösliches Protein des Blutes, das bei Assoziation mit Collagen zu einem Adapterprotein wird, welches die weitere Bindung von Thrombozyten vermittelt [37]. Thrombozyten werden in einer Verletzungsstelle durch die Bindung des vWF an GP Ib nicht nur verankert, sondern auch aktiviert [37]. Zusammengefasst werden Thrombozyten primär in zwei Schritten aktiviert: Der erste Aktivierungsweg erfolgt durch Kontakt mit Collagen des exponierten Subendothels [37]. Der zweite Aktivierungsweg erfolgt über Thrombin, das bei der Auslösung einer Blutgerinnung gebildet wird [37]. Weitere sekundäre Aktivierungswege werden durch Stoffe, die von bereits aktivierten Thrombozyten abgegeben wurden, eingeleitet [37]. Die Aktivierung der Thrombozyten hat folgende Auswirkungen: 1. Formveränderung der Thrombozyten; 2. Konformationsänderung des Glykoproteins GP IIb/IIIa; 3. Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den Granula; 4. Sekretion von Thromboxan und Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF); 5. Einbau negativ geladener Phospholipide in die äußere Schicht der Plasmamembran [37]. Die Konformationsänderung zu GP-IIb/IIIa bindet zudem Fibrinogen und Fibrin [37]. Dadurch werden die Thrombozyten zusätzlich quervernetzt und in das entstehende Fibrin-Netzwerk eingebunden [37]. Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin erfolgt durch Abspaltung von zwei kleinen Peptiden [37]. Hierbei dient Thrombin (= Gerinnungsfaktor-II), das seinerseits durch Proteolyse aus Prothrombin entsteht, als spezifische Protease [37]. Auf zellulärer Ebene führt Thrombin über die proteolytische Spaltung, vermittelt über Glykoprotein-Ib und die protease activated receptors (PAR) - 1 und -4, von Fibrinogen zur Erzeugung von Fibrin [34]. Diese Reaktion der Gerinnungskaskade stellt einen entscheidenden Schritt der sekundären Hämostase dar. Fibrin bindet die aktivierten Thrombozyten und dient als Leitstruktur für

einwandernde Zellen [34]. Gleichzeitig schütten die Thrombozyten im Fibrin-Blutgerinnsel Wachstumsfaktoren und Zytokine aus, wodurch sie immunkompetente Zellen an den Ort der Gewebeverletzung locken [34]. Das Gerinnsel und das umgebende Wundgebiet setzen pro-inflammatorische und -angiogene Wachstumsfaktoren, wie VEGF (vascular endothelial growth factor) TGF-beta (transforming growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor receptor), frei [10, 38, 39].

Durch die Addition der hämostatischen Mechanismen sistiert die Blutung, damit aber auch die Blutversorgung im verwundeten Gebiet, was zur Hypoxie im Gewebe führt.

Hypoxie ist definiert als eine Reduktion der Umgebungs-O<sub>2</sub>-Konzentration. Die meisten Gewebesensoren registrieren eine Hypoxie bei einem pO<sub>2</sub>-Wert um die 40 mmHg oder weniger als 6% O<sub>2</sub> [16, 24, 40]. Hypoxie stellt den physiologischen Reiz zur Induktion und die oberste Regulation der Angiogenese dar [16, 17]. Diese Steuerung wird durch HIF-1-alpha vermittelt, das eine Schlüsselrolle in der Reaktion auf Hypoxie besitzt [41]. HIF-1-alpha ist an der Regulation von Genen beteiligt, die in den Energie-Metabolismus, die Angiogenese sowie die Apoptose involviert sind [41]. Diese Regulation wird justiert durch den heterodimeren Transkriptionsfaktor HIF-1-alpha (Hypoxie induzierter Faktor) [42]. HIF-1-alpha ist der zentrale Faktor für die Sauerstoff Hämostase der Zelle [43]. HIF besteht aus zwei Untereinheiten. Die alpha-Untereinheit mit ihren drei Isoformen (HIF-1-alpha, HIF-2-alpha, HIF-3-alpha) und die beta-Untereinheit, die auch unter dem Namen aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) bekannt ist [24, 43]. Prolyl hydroxylase domain proteins (PHD) und factor inhibiting HIF (FIH) besitzen anders als HIF die Eigenschaft eines Oxygen Sensors (= Sauerstoff-Sensor) [43]. So gelingt die Differenzierung zwischen normoxischen und hypoxischen Sauerstoffverhältnissen. Unter normoxischen Sauerstoffverhältnissen wird die HIF-1-alpha Untereinheit durch PHD hydroxyliert [44]. Die hydroxylierte alpha-Untereinheit hat eine erhöhte Bindungsfähigkeit zu dem von-Hippel-Lindau-Protein (vHL). Das von Hippel-Lindau-Protein ist Bestandteil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes und ist beim Abbau der HIF-1-alpha-Untereinheit maßgeblich beteiligt [41, 45]. Die Hydroxylierung an dem C-Terminalen Ende des von-Hippel-Lindau-Proteins wird unter normoxischen Bedingungen von FIH katalysiert [24].

Unter hypoxischen Sauerstoffverhältnissen ist weder PHD noch FIH funktionsfähig [24]. Der Grund für den Funktionsverlust ist, dass PHD und FIH Dioxygenasen sind [46]. Dioxygenasen sind Enzyme, die molekularen Sauerstoff in ihre Produkte einbauen müssen, um ihre Funktion zu erfüllen [46]. So kommt es durch diesen Funktionsverlust zum Anstieg der HIF-Aktivität. Der stabilisierte Transkriptionsfaktor induziert über direkte und indirekte Signalkaskaden eine Ausschüttung von angiogenen Faktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor B (PDGFB), placental growth factor (PLGF), angiopoietins-1 und -2 und matrix-metalloproteinasen (MMP's) [47]. Der Anstieg der HIF-Aktivität führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Erythropoietin (EPO)-Gen Expression und konsekutiv zu einem Anstieg von Erythrozyten [48]. Das EPO-Gen war das erste Gen für das, nachgewiesen wurde, dass es von der HIF-Aktivität reguliert wird [24]. Weitere Gene, die eine Stoffwechsellumstellung auf anaerobe Glykolyse bewirken, werden ebenso über die HIF-Aktivität reguliert [46, 47]. Insgesamt wurden mehr als 60 Zielgene identifiziert, die über HIF-1 aktiviert werden [47].

### **B.1.b. Phase der Inflammation**

Sobald die Blutung unter Kontrolle ist, migrieren inflammatorische Zellen in die Wunde [36]. Die Chemotaxis ist der dazu führende Prozess, der die inflammatorischen Zellen entlang eines Konzentrationsgefälles von Faktoren an den Ort der Entzündung lockt [49]. Charakteristische inflammatorische Zellen sind Neutrophile, Makrophagen und Lymphozyten [10, 38, 39]. Vor allem Makrophagen spielen auf verschiedene Art und Weise eine Rolle in der Wundheilung [36]. In der frühen Phase der Wundheilung setzen Makrophagen Zytokine frei, die weitere Leukozyten rekrutieren und aktivieren [36]. Außerdem beseitigen sie apoptotische Zellen [36]. Nachdem dies geschehen ist, folgt ein phänotypischer Wandel: Die Makrophagen stimulieren Keratinozyten, Fibroblasten und die Angiogenese, im Sinne der Regeneration [50, 51].

T-Lymphozyten wandern nach den inflammatorischen Zellen und Makrophagen in die Wunde [36]. Deren Zeitpunkt der höchsten Präsenz findet während der späten proliferativen- und der frühen Remodeling-Phase statt [36]. Die genaue Rolle der T-

Lymphozyten ist bis heute nicht völlig verstanden und ist Bestandteil intensiver Untersuchungen [36].

Während des gesamten Prozesses erfährt die Wunde eine physikalische Kontraktion, welche die Wundränder zusammenführt [36]. Dieser Effekt wird durch kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) erzeugt [36, 39]. Die Sekretion von Botenstoffen, wie FGF-2, IGF, TGF-beta stimuliert nicht nur die Collagensynthese der Fibroblasten, sondern auch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [34]. Der Myofibroblast ähnelt den Zellen der glatten Muskulatur und enthält wie diese den kontraktionsfähigen Muskeleiweißkörper Actomyosin [52]. Myofibroblasten führen daher über den Mechanismus der Kontraktion die Wundränder mit einer Geschwindigkeit von bis zu 0,75 mm pro Tag zusammen [53], abhängig davon, wie gut das Gewebe im Wundbereich kontrahiert [53].

### **B.1.c. Phase der Proliferation**

Die Proliferationsphase überschneidet sich in der Regel mit der inflammatorischen-Phase [36]. Sie ist gekennzeichnet durch Reepithelisierung und durch Angiogenese [10].

Über Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF-beta oder VEGF, leiten die Makrophagen die Phase der Proliferation ein, die überlappend mit der inflammatorischen-Phase beginnt [34]. Hauptsächlich vorherrschender Zelltyp sind Endothelzellen und Fibroblasten, die unter dem Einfluss von angiogenen Wachstumsfaktoren, das Kapillarwachstum, die Collagen-Formation und die Formation von Granulationsgewebe auf der Wundseite unterstützen [34]. Es kommt jedoch nicht zur Ausbildung von Elastin, was möglicherweise eine Erklärung für die Steifigkeit und fehlende Flexibilität des Narbengewebes darstellt [34]. Die epitheliale Regeneration wird durch Keratinozyten, die am Übergang zum Normalgewebe liegen, in der Phase der Proliferation und des Remodelings durchgeführt [34]. Diese Keratinozyten migrieren in die obersten Schichten des Granulationsgewebes [34]. Wie zuvor wird die Migration der Keratinozyten von den physiologischen Bedingungen der Wunde gefördert, ebenso von angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen [34]. Die einfache

Epithelialisierung beginnt bei einfachen Wunden bereits wenige Stunden nach der Läsion [34]. Die Reepithelialisierung ist nach 24 bis 48 Stunden, bei gutem Heilungsverlauf und in Abhängigkeit von der Wundgröße, abgeschlossen [34].

### **B.1.d. Phase des Remodelings**

In der sich bereits mit Proliferationsphase überlappenden Remodeling-Phase erschließen viele neue Gefäßstrukturen, das heilende Gewebe. Dies geschieht vor allem nach den Gesetzen der Non-Sprouting-Angiogenese [1].

Neben der Non-Sprouting-Angiogenese treten auch in dieser Phase ständig weitere Umbau- und Umstrukturierungsprozesse auf. So wird der Umbau von Typ-III-Collagen zum Typ-I-Collagen vorangetrieben [34, 54]. Dadurch steigt der Collagenanteil im Wundgebiet an, während die Fibroblastenproliferation im gleichen Zeitraum nachlässt [34]. Der relative Anteil von Collagen-Typ-III zu Collagen-Typ-I verschiebt sich im Laufe der Wundheilung von ursprünglich 30% auf 10%, was dem Verhältnis der unverletzten Haut entspricht [34]. Die Interaktionen zwischen der Extrazellulärmatrix und der Wunde werden über transmembranöse Zellrezeptoren (Integrine) und durch Zytokine reguliert [54]. Die weitere Zunahme der Reißfestigkeit des Narbengewebes hängt von der Vernetzung der Collagenfasern ab [55]. Der Collagen-Aufbau und -Abbau wird teilweise durch MMP's und ihren regulativen Proteinen (TIMP's) gesteuert [55]. Interessanterweise spielt das Verhältnis von MMP's zu ihren regulativen Proteinen (TIMP's) eine noch nicht abschließend geklärte Rolle bei fibrotischen Erkrankungen, hypertrophen Narben und der Keloidbildung [34]. Nach drei Wochen hat das neue Gewebe bereits etwa 30%, nach drei Monaten 80% seiner ursprünglichen Reißfestigkeit zurückerhalten [56]. Restitutio ad integrum mit 100% Reißfestigkeit werden, gewebeabhängig, nicht wieder erreicht [56]. Dermale Strukturen, wie Haarfollikel, Schweißdrüsen und Talgdrüsen, die während der Verletzung verloren gegangen sind, werden nicht regeneriert [52].

Im Allgemeinen heilen akute Wunden, unter physiologischen Bedingungen, innerhalb von drei Wochen [57, 58].

### **B.2. Pathologische Wundheilung**

Chronische Wunden sind dadurch definiert, dass sie nicht innerhalb von drei Monaten vollständig abheilen [57, 58]. Außerdem durchlaufen sie nicht die normalen Stadien der regelrechten Wundheilung (s. Abb. 2.) [33]. Die Wundheilung kann an jeder Stelle der oben genannten Phasen zum Erliegen kommen und beinhaltet einen Integritätsverlust der Haut sowie einer oder mehrerer darunterliegender Strukturen [59]. Ätiologisch besteht immer eine Grunderkrankung, die oft nicht definitiv heilbar ist [60].

Chronische Gewebeschämien in Form von vaskulär oder diabetisch induzierten Wundheilungsstörungen haben eine hohe Prävalenz in der westlichen Welt und führen zu einer hohen Morbidität und Mortalität [61]. Alleine in den USA leiden drei bis sechs Milliarden Menschen an nicht heilenden Wunden [36]. Dies ist mit Gesamtkosten für das amerikanische Gesundheitssystem, um die drei Milliarden Dollar pro Jahr verbunden [35, 62]. Weltweit belaufen sich die Kosten sogar auf 25 Milliarden Dollar pro Jahr [57]. In Deutschland leiden ca. 2,5 bis 3 Millionen Bundesbürger an einer chronischen Wunde (Stand: 2005) [63]. Das spiegelt wider, dass die chronische Wunde nicht nur ein medizinisches Problem darstellt, sondern auch von enormer ökonomischer Bedeutung ist. Weiter sind chronische Wunden und ihre Therapie vor allem ein großes gesellschaftliches Problem [64], denn sie führen zu einer sozialen Isolierung der Patienten, zu lang andauernder Arbeitsunfähigkeit und sie beeinträchtigen die Lebensqualität der Betroffenen nachhaltig [64]. Umso relevanter ist es, dieses medizinische, gesellschaftliche und gleichzeitig für das Gesundheitswesen finanziell belastende Problem zu erforschen und mit geeigneten Therapien anzugehen [63].

Für eine erfolgreiche Behandlung mit dem Ziel der Reparatur bzw. der Regeneration muss eine Revaskularisierung erfolgen [65]. Vaskulär oder diabetisch induzierte Wundheilungsstörungen entstehen auf Basis von Hypoxie. Hypoxie ist üblicherweise der physiologische Reiz zur Anregung von Angiogenese [16]. Paradoxe Weise scheinen diese schlecht heilenden Wunden im Laufe der Zeit eine limitierte Kapazität entwickelt zu haben, auf hypoxischen Stress zu reagieren [16]. Ausschließlich akut

ischämisches Gewebe zeigt einen hohen Prozentsatz von HIF-alpha-positiven Kernen [16]. Das lässt auf eine Unfähigkeit des chronischen Gewebes schließen, ausreichend HIF-alpha zu exprimieren [16]. Die autologe Bildung von angiogenen Faktoren bleibt aus. Des Weiteren scheint die chronische Hypoxie das VEGF-stimulierende Signal auf Endothelzellen durch Herunterregulierung der VEGF-Rezeptor-Expression zu dämpfen [66]. Auch die Kollagenase MMP-8 wird in Verbindung mit pathophysiologischen Wunden gebracht [67, 68]. Dadurch, dass sie nicht nur die synthetischen Produkte von Fibroblasten und Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF und PDGF, abbauen, sondern ebenfalls wichtige Wundkomponenten wie Fibronectin, Alpha-1-Antiprotease und Alpha-2-Macroglobin [67, 68]. Das Fehlen dieser wichtigen Wundkomponenten führt zu einer gestörten Wundheilung. Andererseits wird beschrieben, dass bei chronischen Wunden eine übermäßige Expression von Matrix-Molekülen, wie Fibronectin und Thrombospondin, als Folge einer Dysfunktion und Dysregulation der Zellen in der Wunde erfolgt [60, 69]. Weiterhin wurde geschildert, dass aus chronischen Wunden isolierte Fibroblasten ein verringertes Ansprechen auf die exogene Applikation von Wachstumsfaktoren, wie PDGF-beta und TGF-beta zeigen [60, 70-72]. Vermutlich ist dieser Effekt ebenfalls auf eine Adaptation zurückzuführen. Auch das Wundsekret unterscheidet sich: So enthält das Wundsekret einer physiologischen Wunde eine Vielzahl an Faktoren, die die Zellproliferation fördern wie z.B. Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Interleukin-6 (IL-6) und TGF-alpha und TGF-beta [60]. Während das Wundsekret chronischer Wunden eine geringe Menge dieser wachstumsfördernden Zytokine besitzt [60]. Die Gesamtheit der zitierten Literaturangaben ([16, 60, 66-72]) reflektiert die Erklärungsansätze von Autoren, weshalb der Wundheilungsprozess verlangsamt, nicht vollständig und nicht in koordinierter Art und Weise erfolgt. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Ursache einer pathologischen Wunde in der fehlenden Initiierung und/oder durch die Störung der angiogenen Abläufe zu finden ist. Zur Folge hat dies schlussendlich eine krankhafte Anatomie der Wunde [33]. Für die Behandlung von pathologischen Wunden ist entsprechend ein tiefergehendes Verständnis der Wundheilung und vor allem der Angiogenese erforderlich [63, 64].

Die häufigsten chronischen Wunden sind Ulcera, die mit Ischämie durch pAVK, mit Diabetes mellitus einhergehender Mikroangiopathie und/oder Makroangiopathie oder mit chronisch venöser Insuffizienz assoziiert sind [36, 63, 73]. Diese Krankheiten haben alle eine vaskuläre Komponente gemeinsam [73]. Bei der chronisch venösen Insuffizienz kommt es durch venöse Hypertonie zu strukturellen Veränderungen [73]. Durch die venöse Hypertonie kommt es zu verminderten Kapillardichte [74] und zur Verlängerung der Diffusionswege [73, 75-78]. Bei der pAVK ist der Zusammenhang zwischen Sauerstoffmangel und arterieller Minderperfusion offensichtlich [73, 79]. Bei der diabetischen Wundheilungsstörung kommt es zu einer Mikroangiopathie mit Veränderungen der Gefäßwände, sowie zur Dysregulation der neuronalen Regulation der präkapillären Gefäßweite [73, 80-82]. Somit kann auch in dieser Situation ein zusätzlicher Sauerstoffbedarf nur unzulänglich oder gar nicht gedeckt werden [73]. Durch die vaskuläre Minderversorgung und die Veränderung der extrazellulären Matrix kommt es zu einer dauerhaften hypoxischen Situation. Hierdurch kommt es zu oben beschriebener Adaptation und damit einhergehend zum Ausfall des angiogenen Reizes, der zu unzureichender Wundheilung führt.

### III. Hypothesen

#### A. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss von der extrazellulären Matrix.

Neben einer krankhaften Anatomie der Wunde haben alle chronischen Wunden gemeinsam, dass eine Grunderkrankung besteht, die die Prozesse der Angiogenese stören und die extrazelluläre Matrix verändern.

Daher untersucht diese Arbeit den Effekt parakriner Proteine (= Wachstumsfaktoren; = angiogene Faktoren), welche durch hypoxische prä-Konditionierung von autologen peripheren Blutzellen (PBZ's) gebildet werden, auf die Sprouting-Angiogenese. Aufgrund der Tatsache, dass es bei allen Grunderkrankungen zur Veränderung der extrazellulären Matrix kommt wurden diese parakrinen Proteine, nachdem sie in entsprechender extrazellulärer Matrix (Collagen-Gel, Fibrin-Gel) aufgefangen wurden, auf ihre Fähigkeit hin getestet, Neoangiogenese im Maus Aortic Ring Assay zu induzieren. Das Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, inwieweit die hypoxisch prä-konditionierte PBZ's angiogene Prozesse steuern und stimulieren können, um sie möglicherweise auch einer Therapie zugänglich zu machen. Hierzu wurden folgende Hypothesen entwickelt und überprüft:

- Periphere Blutzellen exprimieren unter hypoxischer Stimulation parakrine Proteine, die die Sprouting-Angiogenese regulieren.
- Die von peripheren Blutzellen exprimierten parakrinen Proteine können in der extrazellulären Matrix gespeichert und abgegeben werden.
- Die extrazelluläre Matrix reguliert biophysikalisch die Zusammensetzung der parakrinen Faktoren und hat folglich Auswirkungen auf die Sprouting-Angiogenese.

## **IV. Material/ Methoden**

### **A. Aortic Ring Assay (ARA)**

Um die Wirkung der parakrinen Proteine auf die Sprouting-Angiogenese und den Einfluss der extrazellulären Matrix zu untersuchen wurde das Maus Aortic Ring Modell verwendet. Es ist eine etablierte Methode, um die Sprouting-Angiogenese zu evaluieren. Das Modell ist vielfach in der Fachliteratur beschrieben [5, 83-85]. An die Literatur angelehnt wurde das Verfahren wie folgt durchgeführt:

#### **A.1. Chirurgische Entnahme der Mauseaorta**

Die Präparation der Sentinel Mäuse unterschiedlichen Geschlechts im Alter zwischen sechs Monaten und einem Jahr erfolgte in steriler Umgebung unter der Sterilwerkbank/ Laminarflow. Sentineltiere sind Kontrolltiere zum Nachweis von latent vorhandenen Erregern in Zucht- oder Versuchspopulationen. Ein wichtiges Qualitätskriterium war es, die Zeitspanne zwischen dem Tod der Maus und der Präparation möglichst gering zu halten. Die Maus wurde durch lizenziertes und qualifiziertes Personal mittels Isofluran-Intoxikation getötet. Von einer Tötung durch Genickbruch ist abzuraten, da es bei dieser Methode häufig zur Beschädigung der Aorta kommt. Bei diesem Eingriff handelte es sich um eine Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken. Eine Meldung an das Veterinäramt erfolgte durch das Zuchtpersonal (§ 9a Absatz 1 TierSchG). Nach gründlicher Desinfektion des Arbeitsplatzes und Vorbereitung des benötigten sterilen chirurgischen Materials wurde die Maus für zwei Minuten außerhalb der Sterilwerkbank (Laminar Flow) in 70% Ethanol eingelegt. Daraufhin wurde die Maus auf dem Rücken liegend für die Präparation an allen vier Extremitäten an der Unterlage aufgespannt. Der Hautschnitt wurde ventral mit einem Längsschnitt mittels eines 11er Skalpell vom Kehlkopf bis zur Schwanzbasis durchgeführt. Durch Präparation mit der stumpfen Schere konnte die Haut von der darunterliegenden Muskelschicht abgelöst und ebenfalls weggespannt werden. Es wurde vor Öffnung der Muskelschicht eine

weitere Desinfektion mit 70% Ethanol durchgeführt und mit sterilen Kompressen abgetupft. Außerdem wurden die bereits verwendeten chirurgischen Instrumente gegen sterile Instrumente eingetauscht. Im nächsten Schritt wurde die Muskelschicht durch einen weiteren Längsschnitt durchtrennt, um den Thorax und den Bauchraum zu öffnen. Zur Darstellung und sicheren Identifizierung der Aorta wurde der Darm mit sterilen Wattestäbchen zur Seite geschoben. Es wurde besonders darauf geachtet, dass eine Verletzung der Darmwand vermieden wurde. Um die Sicht auf die Aorta zu verbessern, konnten sicher identifizierte Organe entfernt werden. Natürlich wurden nur Organe entfernt, die ohne Bedenken hinsichtlich einer Kontamination entfernt werden konnten, also z.B. keine Darmanteile. Die Aorta liegt retroperitoneal entlang der Wirbelsäule. Bei einer einwandfreien Sicht und einer eindeutigen anatomischen Verifizierung, wie kranial der Ursprung aus dem Arcus aortae, sowie kaudal die Aufzweigung in die Iliakalgefäße oder die Abgänge zu den Nieren, erfolgte die weitere Präparation mittels Lupenbrille (2,5-fache Vergrößerung). Mittels mikrochirurgischen Bestecks wurde der kraniale Anteil der Aorta am Arcus aortae abgelöst und weiter Richtung kaudal präpariert und unmittelbar nach vollständiger Ablösung in mit opti-MEM Reduced Serum medium (Life Technologies, Germany) gefüllte Petri Schalen gelegt. Dem opti-MEM Reduced Serum medium war ebenfalls ein Antimykotikum sowie ein Antibiotikum (Streptomycin) zugesetzt.

### **A.2. Präparation der Mauseorta**

In den Petrischalen wurde die Aorta mikrochirurgisch von Fettresten und Gefäßabgängen gesäubert und das Lumen vorsichtig mit opti-MEM Reduced Serum Medium (Life Technologies, Germany) gespült, sodass das Lumen sich entfaltete. Nach vollständiger Säuberung wurde die Aorta mit einer mikrochirurgischen Schere in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten. Die Schnittführung der Ringe wurde anhand einer Schablone standardisiert, um möglichst exakt gleich große Ringe zu erhalten. Von entscheidender Bedeutung für die Qualität des Ringes war die möglichst exakte Einhaltung einer Schnittachse, die möglichst rechtwinklig zur Längsachse des Gefäßes verläuft. Durch die rechtwinklige Fläche gelang eine deutlich bessere

Platzierung im Well und ermöglichte somit die Sicht auf das offene Lumen des Ringes im Matrigel (BD Matrigel Basement Membrane Matrix High Concentration von Biosciences). Die Ringe durften nicht zu lang werden, da sie sich ansonsten bei der Platzierung in der Matrigel-Matrix verdrehten. Ein Verhältnis (Länge zu Breite) von 1:1 war optimal. Bei Abweichungen verdrehte sich der Ring und das Lumen war nicht mehr einzusehen. Bei optimalem Verlauf konnten 20 bis 25 Ringe aus einer einzigen Mauseorta extrahiert werden. Jeder brauchbare Ring wurde in eine neue mit opti-MEM Reduced Serum Medium (Life Technologies, Germany) gefüllte Petrischale transferiert. Diese Petrischale wurde anschließend bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht gelagert. Die Lagerung über Nacht diente der Serum Starvation und hatte den Zweck, dass alle Ringe in ein Gleichgewicht gebracht wurden, um der Auswertung eine Art uniforme Startlinie zu bieten [5].

### **A.3. Kultivierung der Mauseorta in Matrigel**

Die erste Matrigel (BD Matrigel Basement Membrane Matrix High Concentration von Biosciences) Schicht (50 µl/ well) wurde bereits am Tag der Entnahme auf der 96 Well-Platte gecoatet und über Nacht härten gelassen. Das Matrigel wurde dazu bereits am Vortag in einem Verhältnis von 1:6 mit DMEM (w/ o phenol; + ab/ am) vorbereitet. Um es am Vortag vorbereiten zu können, musste es über Nacht auf Eis im Kühlschrank aufgetaut werden. Ohne den Indikator im Medium wurde die spätere Mikroskopie erleichtert bzw. die Bildqualität verbessert. Das Platzieren der Aorten-Ringe wurde unter Zuhilfenahme der Lupenbrille und des mikrochirurgischen Besteckes durchgeführt. Im Detail wurde das Lumen des Ringes unter Vergrößerung auf die Spitze einer mikrochirurgischen Pinzette aufgestülpt. War dies bewerkstelligt, wurde der auf der Pinzette aufgestülpte Ring senkrecht, medial in das mit Matrigel gefüllte Well eingetaucht. Dadurch, dass das Matrigel bereits gehärtet war und somit eine höhere Viskosität besaß, streifte sich der Ring von der Pinzettenspitze in die untere Schicht des Matrigels ab. Durch diese Technik wurde erreicht, dass der Ring nicht verdreht in der Gelmatrix lag und das Lumen gut einzusehen war. Nach Platzierung aller Ringe im Well wurde noch einmal die Lage aller Ringe kontrolliert und falls nötig

vorsichtig korrigiert. Die 96 Well-Platte musste zudem sehr vorsichtig behandelt werden und wurde daher möglichst wenig bewegt. Die horizontale Position der Platte wurde nicht verändert. Nachdem die Lage aller Ringe zufriedenstellend war, konnte vorsichtig die zweite Schicht Matrigel (50 µl) aufgetragen werden. Die Ringe lagen nun eingebettet in einer oberen und unteren 50 µl dicken Matrigel-Schicht. Entscheidend war, dass die Ringe komplett im Matrigel lagen, da ansonsten keine Angiogenese möglich war. Zur Aushärtung der oberen Matrigel Schicht wurde die mit Ringen bestückte 96 well-Platte wieder sechs bis acht Stunden bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der sechs bis acht Stunden konnte dann in jedes Well 150 µl der entsprechenden Untersuchungsgruppe hinzugefügt werden. Die Pipettenspitze wurde dazu an die Wand der Well-Platte gehalten. Dadurch konnte vermieden werden, dass die 150 µl der entsprechenden Untersuchungsgruppe frontal auf das Matrigel trafen und somit die Intaktheit des Versuchsaufbaus beschädigte. Es wurden drei Ringe je Untersuchungsgruppe getestet. Die in dieser Arbeit getesteten und direkt miteinander verglichenen Untersuchungsgruppen stammen aus denselben Versuchsaufbauten.

### **A.4. Mediumwechsel**

Der Mediumwechsel wurde alle drei Tage unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Zwischen den Medienwechseln wurden alle Untersuchungsgruppen bei 4 Grad Celsius (im Kühlschrank) gelagert. Dazu wurden 120 µl des alten Mediums entnommen und 150 µl des neuen Mediums hinzugegeben. Bei jedem Mediumwechsel wurde viel Wert darauf gelegt, die Matrigel-Schicht möglichst unberührt zu lassen. So wurde anstatt den letzten Rest des alten Mediums zu entfernen, immer der Intaktheit der Matrigel Schicht der Vorrang gegeben. Um dies für alle Untersuchungsgruppen zu standardisieren wurde die Entnahme von 120 µl beschlossen.

## **B. Herstellung der extrazellulären Matrix**

### **B.1. Herstellung des Collagen-Gels**

Das Collagen-Gel, welches für einige der folgenden Untersuchungsgruppen verwendet wurde, musste im Vorfeld hergestellt werden. Dazu wurde die Collagen-Lösung (4 mg/ml, Biochrom AG) auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden 4 ml der Collagen-Lösung zusammen mit 0,5 ml von 10x MEM in ein 50 ml-Röhrchen gegeben. Dieses wurde so lange geschüttelt bis eine blass gelblich uniforme Färbung entstand. Danach folgte die Neutralisation der Collagen-Lösung mit tröpfchenweiser Zugabe (15  $\mu$ l) von 0,5 M NaOH, während das 50 ml-Röhrchen weiter kontinuierlich geschüttelt wurde. An einem Farbumschlag des Indikators von gelb ins violett war die erfolgreiche Neutralisierung erkennbar. Nach Farbumschlag wurde noch ein weiterer Tropfen (15  $\mu$ l) 0,5 NaOH hinzugegeben. Durch diesen weiteren Tropfen erfolgte eine bessere Polymerisation. Das neutralisierte Collagen-Gel wurde danach umgehend in die Inserts pipettiert. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub>, damit das Gel vollständig polymerisieren konnte. War dies geschehen, konnte die Methodik der entsprechenden Untersuchungsgruppe fortgeführt werden.

### **B.2. Herstellung des Fibrin-Gels**

Für die Herstellung von Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup> wurde 1 ml Fibrin-Gel (Tissuecol Duo S 1 ml Immuno, Baxter, Germany) als Matrix in das Insert gegeben. Die Fibrinogen-Menge in dieser Untersuchungsgruppe betrug 40 mg.

Für Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> wurden entsprechend 2 ml Fibrin-Gel (Tissuecol Duo S 1 ml Immuno, Baxter, Germany) als Matrix in das Insert gegeben. Die Fibrinogen-Menge in dieser Untersuchungsgruppe betrug 80 mg.

Beide Fibrin-Gel-Untersuchungsgruppen waren demnach gleicher Dichte (40 mg/cm<sup>3</sup>).

## **C. Herstellung der Untersuchungsgruppen**

### **C.1. Negativ-Kontrolle: AIM**

Als negativ-Kontrolle im Aortic Ring Assay wurde das Medium AIM (AIM V, Invitrogen, Germany) verwendet.

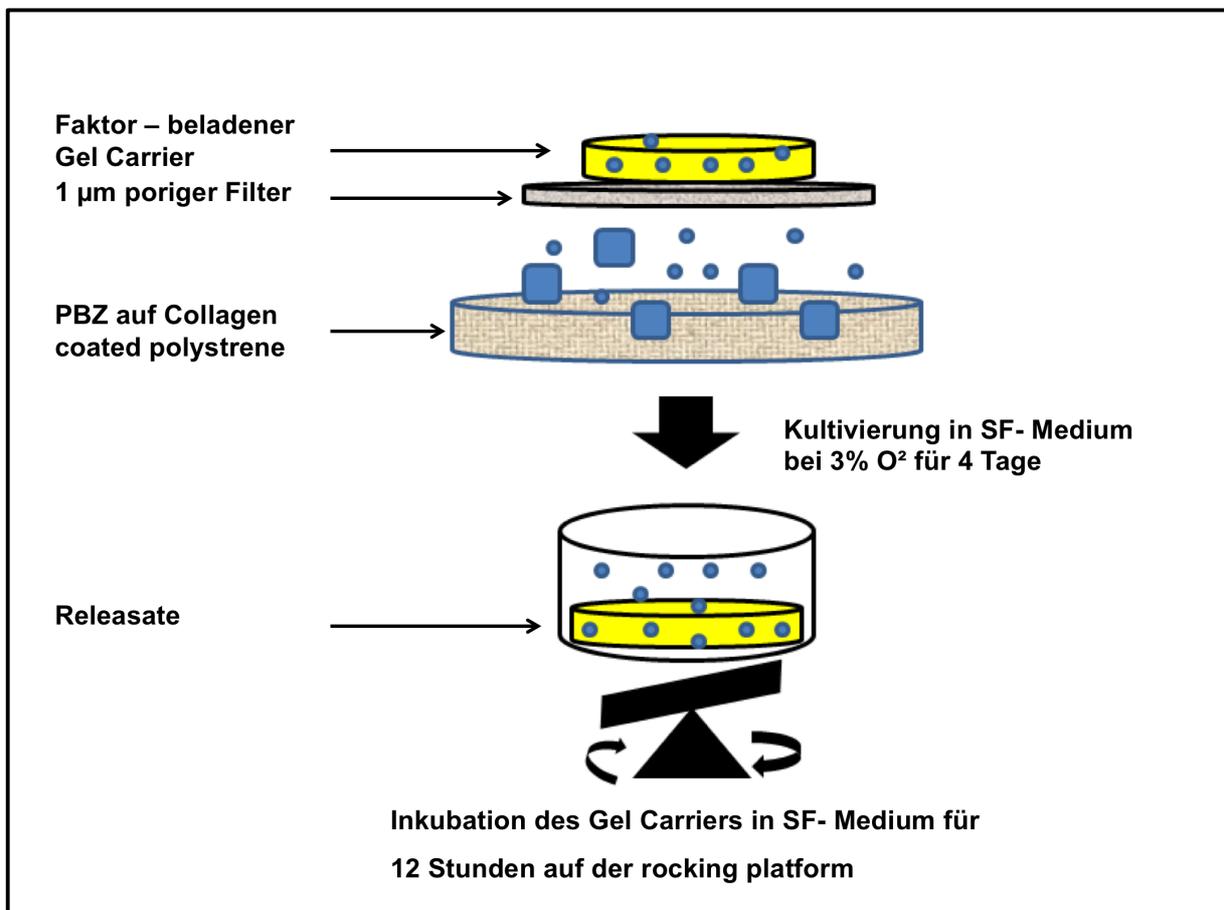
### **C.2. Positiv-Kontrolle: VEGF**

Um die positiv-Kontrolle VEGF (Rekominant Human VEGF 165) im Aortic Ring Assay zu testen, wurde es in einer Konzentration von 90 ng/ml zu AIM gegeben. Aufgrund von nichtveröffentlichten Vorversuchen wurde die entsprechende Konzentration gewählt, da sich unter Verwendung niedrigerer Konzentrationen keine Sprouting-Angiogenese zeigte.

### **C.3. Collagen-Gel-Releasate**

In diesem Versuch wurden wie von Hadjipanayi et al. [86] beschrieben, 10 ml peripheres Blut eines 23-jährigen, gesunden männlichen Nichtraucher (BMI= 21 kg/m<sup>2</sup>) verwendet. Die Blutabnahme erfolgte nach den üblichen Standards einer peripher-venösen Blutabnahme. Der buffy coat wurde mittels Zentrifugation in EDTA-Vacutainern (BD, Germany), mit 3000 rpm (= 1711 g) / 4 Grad Celsius für 10 min isoliert. Nach der Isolierung wurde 1 ml des buffy coats mit 10 ml Serum freien Mediums (AIM V, Invitrogen, Deutschland) gemischt. Aus dieser Mischung, bestehend aus PBZ's und AIM, wurde 1 ml entnommen und auf eine mit Typ-I-Collagen beschichtete 6 Well-Platte gegeben. Die Beschichtung erfolgte im Vorfeld durch den Hersteller (BD, Germany) und diente der Aktivierung von Wachstumsfaktor produzierenden Zellen. Auf die 1 µm kleinporige Membran (Filter) der Inserts (BD, Germany) wurden 3 ml Collagen-Gel hinzugegeben und gewartet bis diese ihre

Gelform angenommen hatten. Dies entspricht einem Volumen von 3 cm<sup>3</sup>. Für die PF-4 Proteinquantifizierung des Collagen-Gel-Releasate wurden 2 ml verwendet, um ein vergleichbares Volumen (2 cm<sup>3</sup>) zu erhalten. Danach wurden die Inserts in der 6 Well-Platte platziert und 1 ml AIM hinzugegeben. Es erfolgte daraufhin eine viertägige Kultivierung unter Hypoxie (3% O<sub>2</sub>). Nach abgelaufener Kultivierung wurde das Collagen-Gel aus den Inserts entnommen und mit 1,5 ml AIM über Nacht auf einer rocking platform inkubiert. Durch die Bewegung der rocking platform konnten die Faktoren aus dem Collagen-Gel in das Medium freigelassen werden. Die Bewegung der rocking platform führte zu einer besseren Durchmischung, sodass für die Diffusion ein günstiger Gradient entstand. Dieses Medium, entstanden aus den diffundierten parakrinen Proteinen des Collagen-Gels (folgend: Collagen-Gel-Releasate) war nun bereit, um im Aortic Ring Assay getestet zu werden.



**Abb.3.:** Schematische Herstellung von PBZ produzierenden, Hypoxie- induzierten Wachstumsfaktoren [86]

Eine schematische Darstellung der beschriebenen Methodik, wie aus PBZ's hypoxisch induziert Wachstumsfaktoren produziert wurden, ist in Abb. 3. dargestellt.

Die Herstellung der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel+ Anti-VEGF-Releasate ist dem o.g. Verfahren sehr ähnlich. Der entscheidende Unterschied ist die Blockierung des Angiogenesefaktors VEGF. Daher enthielt das Medium AIM 60 µl Antikörper „mouse anti human VEGF (Invitrogen, Deutschland)“ in einer Konzentration von 20 µg/µl. Dieser Zusatz stellte den entscheidenden Unterschied zur Herstellung der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate ohne Blockierung dar. Das Medium, bestehend aus den Faktoren des Collagen-Gels und dem blockierten VEGF (Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate), war nach zwölf Stunden Kultivierung auf der rocking platform bereit, um im Aortic Ring Assay getestet zu werden.

### **C.4. Fibrin-Gel-Releasate**

Die Herstellung der Kondition Fibrin-Gel-Releasate erfolgte ähnlich dem unter Collagen-Gel-Releasate beschriebenen Vorgehen und der schematischen Darstellung in Abb. 3. Der Unterschied der Untersuchungsgruppen bestand in der Verwendung von Fibrin (Tissuecol Duo S 1ml Immuno, Baxter, Germany), in unterschiedlichen Volumen und Fibrinogenkonzentrationen, (siehe unter: Herstellung des Fibrin-Gels) als extrazelluläre Matrix.

Nach vier Tagen Kultivierung unter Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) wurde das Fibrin-Gel ebenfalls mit 1,5 ml AIM über Nacht auf die rocking platform gestellt. Das entstandene Medium aus den diffundierten parakrinen Proteinen des Fibrin-Gels (Fibrin-Gel-Releasate) war ebenfalls nach zwölf Stunden bereit, um im Aortic Ring Assay getestet zu werden.

Die zweite Kondition, für die eine Blockierung eines Angiogenesefaktors durchgeführt wurde (Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate) ist der Verfahrensanleitung oben ähnlich und unterschied sich nur in der Blockierung des Angiogenesefaktors PF-4. Nach 4 Tagen Kultivierung unter Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) wurde das Fibrin-Gel ebenfalls mit 1,5 ml AIM über Nacht auf der rocking platform platziert. Das AIM enthielt, anders zur Herstellung der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate, jedoch 60 µl rabbit-

anti-human-PF-4 Antikörper (Abcam, Germany) in einer Konzentration von 10 µg/µl. Nach Kultivierung über Nacht konnte die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> mit blockiertem Angiogenesefaktor PF-4 (Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>+ Anti-PF-4-Releasate) zum Testen verwendet werden.

### **C.5. Serum**

Um Blutserum zu gewinnen wurde 10 ml peripheres Blut eines 23-jährigen, gesunden männlichen Nichtraucher (BMI= 21 kg/m<sup>2</sup>) in einem STT-II advance BD Vacutainer-Röhrchen entnommen. Nach der Empfehlung des Herstellers wurde nach fünf Inversionen und 30-minütiger „clotting time“ das STT-II advance Röhrchen bei 1200 rpm (= 274 g) und 20 Grad Celsius (Raumtemperatur) zentrifugiert. SST's charakterisieren sich durch einen Clot activator und ein enthaltenes spezielles Gel, das die Blutzellen und das Serum während der Zentrifugation separiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Röhrchen, immer in vertikaler Lage, vorsichtig geöffnet und das gelbliche Serum abpipettiert. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen wurde genügend Abstand zum buffy coat eingehalten. Um dies zu standardisieren wurde ein Abstand von 0,5 cm vom buffy coat entfernt definiert. Dieser Abstand wurde mittels Maßband von außen abgemessen und markiert.

Das Blutserum entspricht dem flüssigen Teil des Blutes nach abgeschlossener Gerinnung [37]. Aufgrund der Gerinnungsvorgänge fehlt vor allem Fibrin bzw. Fibrinogen im Serum [37].

### **C.6. Cultured-Clot-Releasate**

Zuerst wurde 12 ml peripheres Blut eines 23-jährigen, gesunden männlichen Nichtraucher (BMI= 21 kg/m<sup>2</sup>) in einer 10 ml Spritze aufgesammelt. Die Spritze wurde unten mit einem Combi Stopper verschlossen und der Spritzenkolben entnommen. Die Öffnung des fehlenden Spritzenkolbens wurde dreischichtig mit Parafilm verschlossen. Mit dem Combi Stopper nach unten wurde die Spritze einen Tag bei 37 Grad Celsius

und normoxischen Bedingungen kultiviert. Durch die aufrechte Lage der Spritze während der Inkubation, erfolgte eine physiologische Sedimentation. Am Tag nach der Inkubation wurde Serum und der Fibrin clot in ein neues 15 ml-Röhrchen transferiert. Auf dem Boden dieses Röhrchen befand sich Collagen-Gel. Das Collagen-Gel wurde nach bekannter Vorgehensweise hergestellt und auf dem Boden platziert. Daraufhin wurde das 15 ml-Röhrchen verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Diese Zusammenstellung wurde dann für weitere drei Tage unter 37 Grad Celsius und normoxischen Bedingungen kultiviert. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 1300 rpm (= 321 g) und 20 Grad Celsius. Vom zellfreien Überstand wurden jeweils 3 ml abpipetiert und im Aortic Ring Assay getestet.

### **D. Quantitative Proteinbestimmung**

#### **D.1. ELISA: VEGF**

Zur Quantifizierung von VEGF wurde das Quantikine®-Human-VEGF-Immunoassay verwendet. Genutzt wurde die standardisierte Methodik des Herstellers, die einen monoklonalen Antikörper, spezifisch für VEGF, verwendet. Die Quantifizierung fand zeitlich parallel zur Untersuchung der Untersuchungsgruppen im Aortic Ring Assay statt. Für jede Untersuchungsgruppe wurden jeweils drei biologische und drei technische Replikate getestet.

Der Hersteller hatte diesen monoklonalen Antikörper auf einer Mikroplatte prä-coated. Die Standards und die Proben wurden in die Wells pipettiert. VEGF wurde dabei durch die unbeweglichen Antikörper auf dem Boden gebunden. Durch einige Waschschrte wurden alle ungebundenen Moleküle aus den Wells entfernt. Ein Enzym, welches am polyklonalen Antikörper gebunden war und wiederum spezifisch für VEGF ist, wurde in die Wells pipettiert. Alle ungebundenen polyklonalen Antikörper wurden durch weitere Waschschrte entfernt. Als letzter Schritt wurde die Substrat-Lösung hinzugegeben, die in Proportion zur Menge an VEGF, die im ersten Schritt gebunden wurde, eine Färbung anzeigte. Diese Farbtintensität konnte mittels Photometrie gemessen und so die Menge an VEGF quantifiziert werden. (Quelle: Quantikine®)

Human VEGF Immunoassay; R&D Systems; Katalognummer: DVE 00, SVE 00, PDVE 00).

### **D.2. ELISA: PF-4**

Zur Quantifizierung von PF-4 wurde das Quantikine®-Human-PF-4-Immunoassay verwendet. Die Quantifizierung fand ebenfalls zeitlich parallel zur Untersuchung der Untersuchungsgruppen im Aortic Ring Assay statt. Für jede Untersuchungsgruppe wurden jeweils drei biologische und drei technische Replikate getestet.

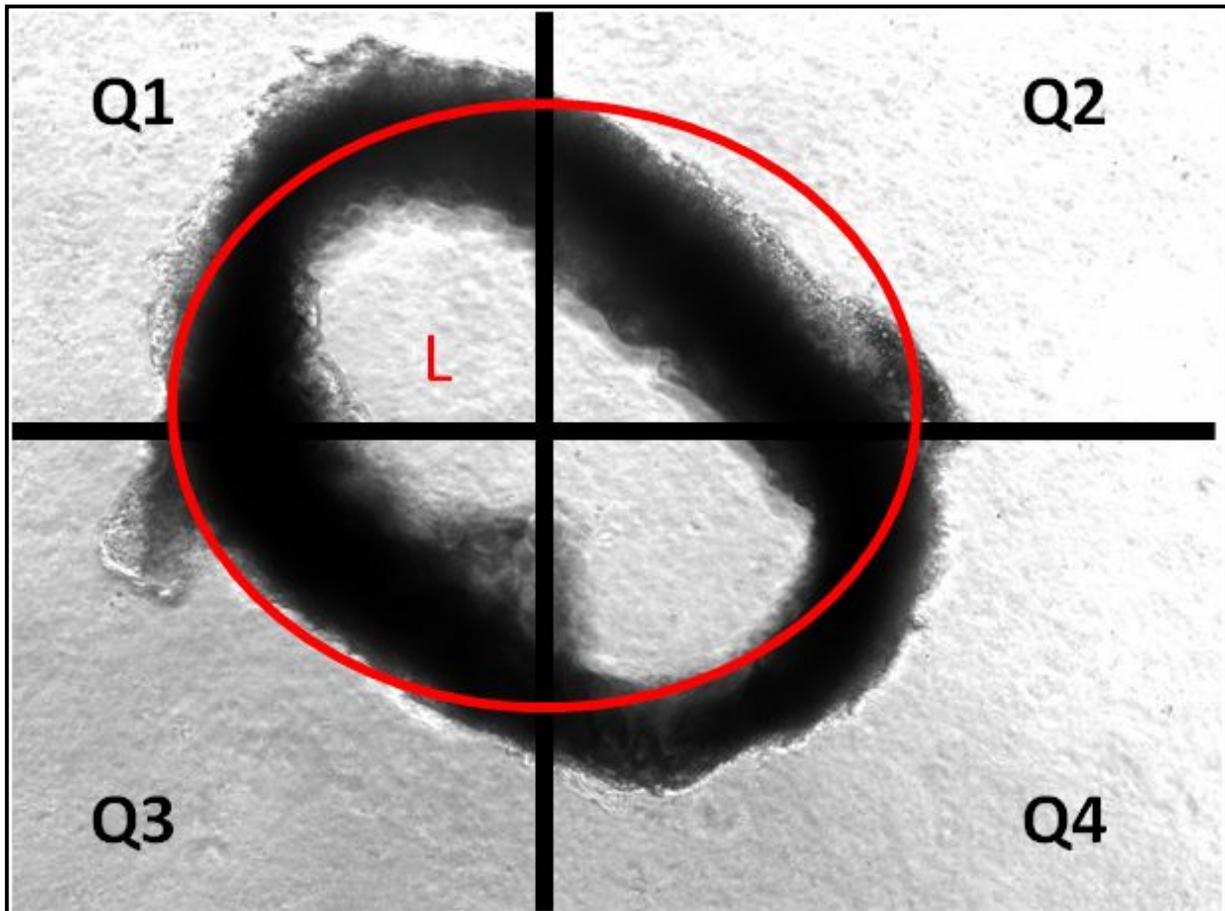
Diese standardisierte Methode funktionierte vom Prinzip her identisch wie der beschriebene ELISA für VEGF. Natürlich banden die monoklonalen Antikörper auf der Mikroplatte ausschließlich PF-4, anstatt VEGF. (Quelle: Quantikine® ELISA; Human CXCL4/ PF-4 Immunoassay; R&D Systems; Katalognummer: DPF40)

## **E. Auswertung**

### **E.1. Mikroskopische-Quantifizierung der Sprouting-Anzahl**

Die erste Kontrollmikroskopie durch das Zeiss-Mikroskop erfolgte am Tag nach begonnener Inkubation (erster Tag), sodass die Platte mit den Aorten-Ringen über Nacht erst einmal ohne weitere Berührung bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurde. So konnte das Matrigel vollständig härten. Kontrollmikroskopien fanden standardmäßig am dritten Tag, fünften Tag und achten Tag statt. Dazu wurde jeder einzelne Ring nach einem standardisierten Schema fotografiert. Das Schema sah eine Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung vor, außerdem wurde der Ring in Quadranten unterteilt („Q1-Q4“; s. Abb. 4.) und jeder Quadrant in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Dann folgte ein Bild des Lumens („L“ und rote Eingrenzung; s. Abb. 4.) in 20-facher Vergrößerung und ein Bild exponierter Stellen in 40-facher Vergrößerung. Unter exponierten Stellen können Areale gemeint sein, die

ohne die 40-fache Vergrößerung schlecht auszuwerten gewesen wären oder besonders eindrucksvolle Gefäßverzweigungen, die dokumentiert werden sollten.

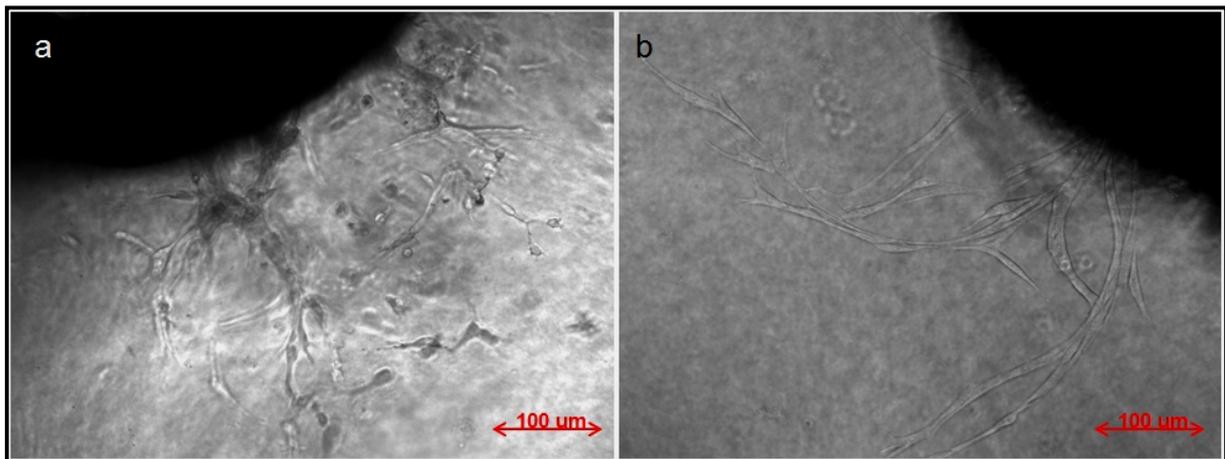


**Abb. 4.:** Einteilung des Aorten-Ringes in Quadranten zur Mikroskopie

Eine besondere Schwierigkeit stellte dar, dass mehrere Ebenen eingestellt werden mussten, um bei der Dreidimensionalität des Ringes keine ausgesprossenen Gefäße zu übersehen. Die Mikroskopie der 96 Well-Platte wurde alle 45 min für eine Dauer von 15 min unterbrochen, um die Platte bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> zu inkubieren. Erst danach wurde an entsprechender Stelle die Mikroskopie für weitere 45 min fortgeführt.

Bei der Auswertung der Bilder zählten per Definition alle Gefäße als ein solches, wenn diese Gefäße Kontakt zum Ring hatten oder Kontakt zu einem Gefäß, welches Kontakt zu dem Ring besaß.

Eine Ausnahme dieser Regelung bestand für Wachstum durch Fibroblasten ähnliche Strukturen. Diese Strukturen unterschieden sich für das geübte Auge von der Struktur eines Neovessels. Wie in Abb. 5.b zu erkennen, sind die aus Fibroblasten entstandenen Strukturen, die nicht in die Wertung einfließen, transparenter als die gewerteten Gefäßstrukturen (s. Abb. 5.a). Außerdem neigten die aus Fibroblasten entstandenen Strukturen dazu, weiter in die Peripherie zu migrieren.



**Abb. 5.a)** Beispiel für regelrechte Neovessels aus der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel; **5.b)** Beispiel für nicht gewertete Strukturen, entstanden aus proliferierten Fibroblasten, exemplarisch aus der Untersuchungsgruppe VEGF 90 ng/ml

### E.2. Quantifizierung der Sprouting-Länge

Die Messung der ausgesprossenen Gefäße wurde durch Image-Analyse durchgeführt. Verwendet wurde das Programm Image J Software (NIH, USA).

### E.3. Übersicht der Auswertungen jeder Untersuchungsgruppe

Die folgende Abbildung (s. Abb. 6.) gibt eine Übersicht über die jeweiligen Untersuchungsgruppen, die in dieser Arbeit getestet und gleichzeitig über die

angewandten Methoden, die für die jeweilige Untersuchungsgruppe angewendet wurden. Zum einen wurden die Untersuchungsgruppen im Aortic Ring Assay getestet und über die Mikroskopie die Anzahl an Sproutings ermittelt. Zum anderen wurde die Länge der Sproutings mit Hilfe der Image-J-Software bestimmt. Weitere Auswertungen erfolgten über Proteinquantifizierung von VEGF und PF-4 einzelner Untersuchungsgruppen.

Aortic Ring Assay (Anzahl)	Aortic Ring Assay (Länge)	Proteinquantifizierung VEGF	Proteinquantifizierung PF-4
Neg.-Kontrolle AIM	Neg.-Kontrolle AIM		
Pos.-Kontrolle VEGF	Pos.-Kontrolle VEGF		
Collagen-Gel-Releasate	Collagen-Gel-Releasate	Collagen-Gel-Releasate	Collagen-Gel-Releasate
Collagen-Gel+ Anti-VEGF		Collagen-Gel+ Anti-VEGF	
Fibrin-Gel 1 cm <sup>3</sup>	Fibrin-Gel 1 cm <sup>3</sup>		Fibrin-Gel 1 cm <sup>3</sup>
Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup>	Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup>		Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup>
Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup> + Anti-PF4	Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup> + Anti-PF4		Fibrin-Gel 2 cm <sup>3</sup> + Anti-PF4
Serum			
Cultured-Clot-Releasate			

**Abb. 6.:** Übersicht der Auswertungen jeder Untersuchungsgruppe

(Die verwendete Farbe der jeweiligen Untersuchungsgruppe zieht sich konstant durch die gesamte Arbeit und soll die Orientierung erleichtern.)

## F. Statistik

Die Quantifizierung der Gefäßaussprossungen erfolgte jeweils für jeden einzelnen Quadranten und das Lumen jedes einzelnen Ringes an den definierten Beobachtungstagen (1., 3., 5., 8. Tag). Für jede Untersuchungsgruppe, sowohl im Aortic Ring Assay als auch für die Proteinquantifizierungen, wurden drei Wells ausgewertet (n=3).

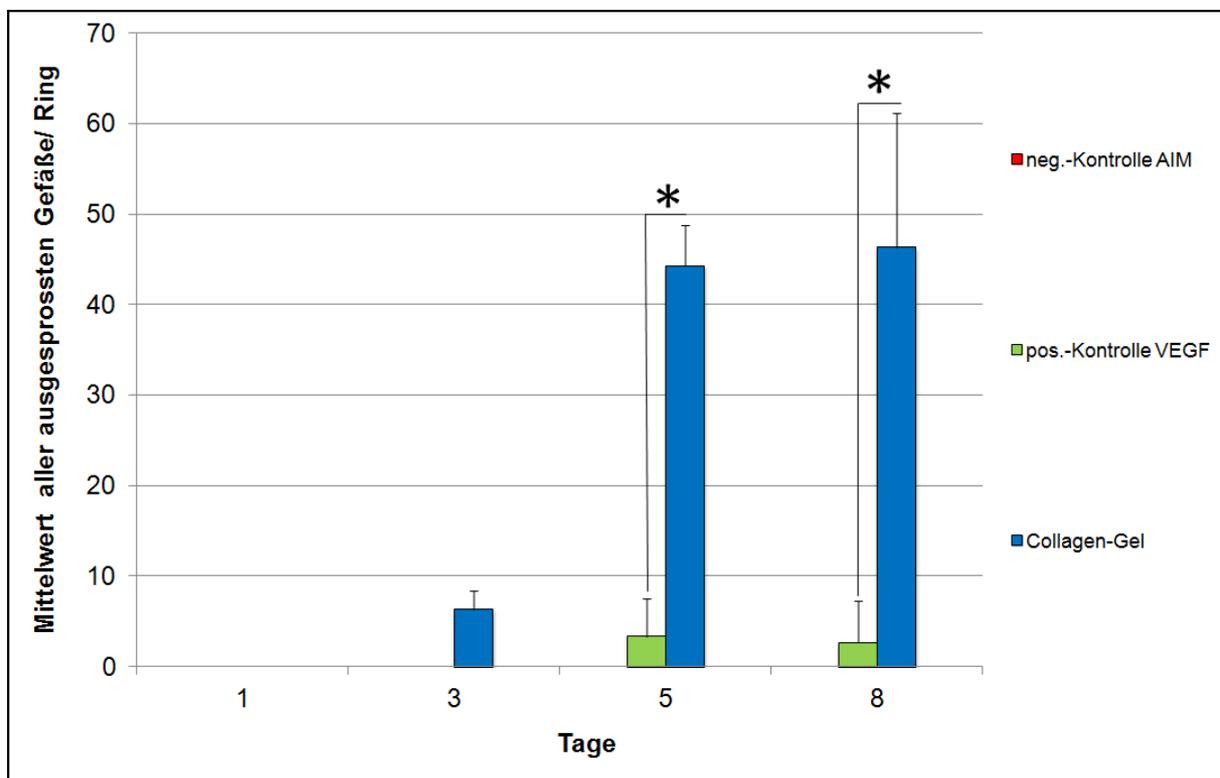
Die Summe aller Quadranten diente für alle drei Wells jeder Untersuchungsgruppe zur Ermittlung des Mittelwertes und der Standardabweichungen mittels Excel (Microsoft). Die Mittelwerte und Standardabweichungen boten die Grundlage der erstellten Plots. Die statistische Analyse wurde mittels unabhängigen Student's t-Test durchgeführt. So konnten mittels der „t-Test Graph-Pad Software“ zwei Gruppen miteinander verglichen werden. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte dies mittels einfaktorieller Analyse der Varianz (ANOVA).

Das Signifikanzniveau, also die Wahrscheinlichkeit einen Fehler erster Art zu begehen, wurde auf 5% festgelegt ( $\alpha = 0,05$ ).

## V. Ergebnisse

### A.1. Angiogenes Potential parakriner Proteine, gewonnen aus hypoxisch prä-konditionierten peripheren Blutzellen.

In dieser ersten Untersuchung wurde getestet, ob die aus autologen peripheren Blutzellen entstandenen parakrinen Proteine nach Freisetzung aus einer Collagen-Gel-Matrix die Fähigkeit besitzen, Sprouting-Angiogenese im Aortic Ring Assay zu erzeugen.

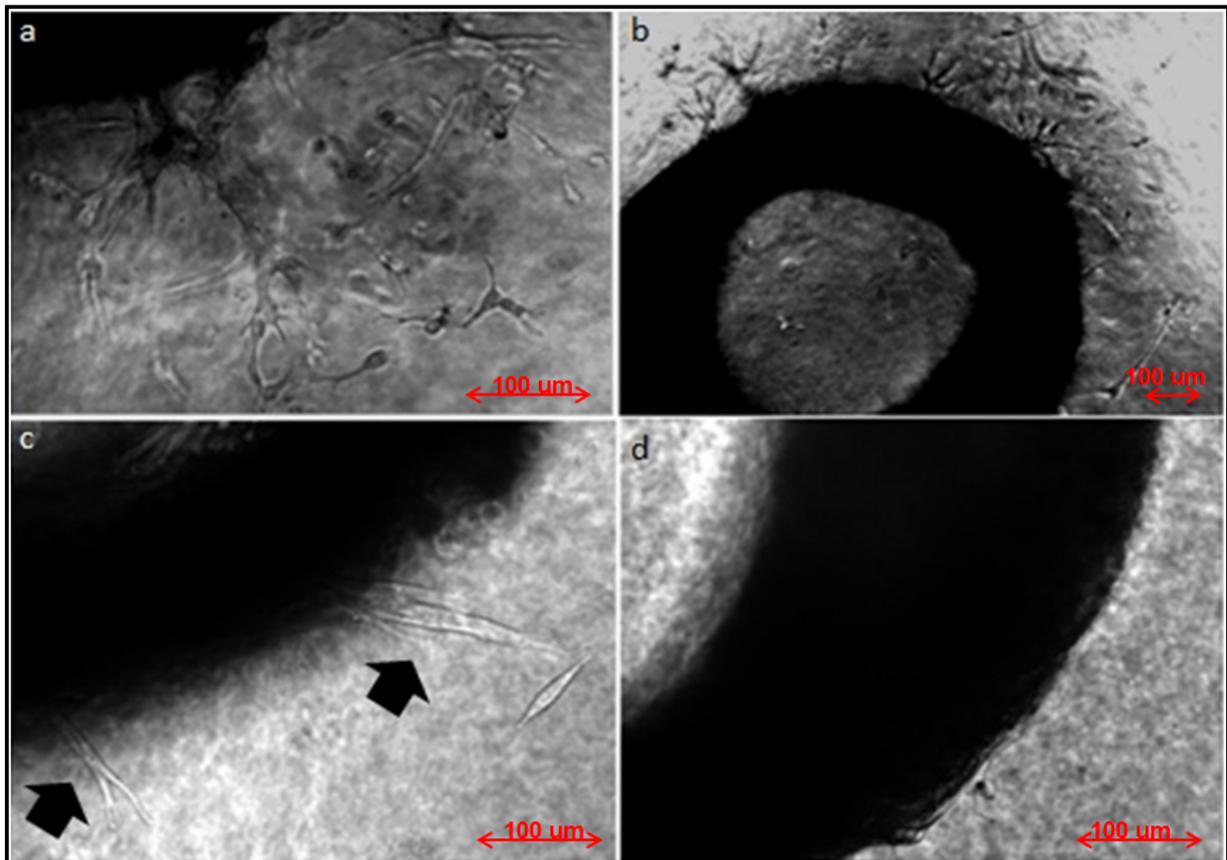


**Abb. 7.:** Collagen-Gel-Releasate vs. VEGF; (\* = $p < 0,05$ )

Die Analyse (s. Abb. 7.) der Gefäßneubildung im Maus Aortic Ring Assay zeigte, dass weder in der Negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 8.d), noch in der positiv-Kontrolle VEGF am dritten Beobachtungstag eine Gefäßaussprossung gebildet wurde. Während die Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate hingegen bereits am dritten Tag der

Kultivierung Sprouting-Angiogenese vorwies. Collagen-Gel-Releasate zeigte also zu einem früheren Zeitpunkt, im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, dass die gewonnenen parakrinen Proteine die Fähigkeit besaßen Sprouting-Angiogenese zu erzeugen.

Die negativ-Kontrolle AIM blieb auch am fünften Beobachtungstag ohne Gefäßwachstum. Ein Unterschied zum letzten Kontrolltag war, dass sich auch in der positiv-Kontrolle VEGF Gefäße gebildet hatten (s. Abb. 8.c). Diese waren jedoch signifikant weniger im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate ( $p=0,0003$ ). Die Anzahl der Gefäße in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate hatten im Vergleich zum vorherigen Beobachtungstag deutlich zugenommen (s. Abb. 8.a und Abb. 8.b).



**Abb. 8.a+8.b) Collagen-Gel-Releasate; 8.c) pos.-Kontrolle VEGF; 8.d) neg.-Kontrolle AIM**

Die negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 8.d) blieb ebenfalls am achten Beobachtungstag gefäßfrei. Die Untersuchungsgruppe VEGF zeigte einige Fibroblasten ähnliche Strukturen, welche nicht in die Quantifizierung einfließen. Während in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate (s. Abb. 8.a und Abb. 8.b) die Gefäßstrukturen als eine Art Gefäßnetz prominent wurden, sah man in der Untersuchungsgruppe VEGF (s. Abb. 8.c) nur vereinzelt ausgesprossene Gefäße. Die Anzahl der Gefäßstrukturen von Collagen-Gel-Releasate waren etwa vergleichbar mit dem Ergebnis des fünften Tages. Der signifikante Unterschied, der bereits am vorherigen Beobachtungstag beobachtet werden konnte, war ebenso am letzten Kontrolltag (achter Tag) ersichtlich ( $p=0,0082$ ).

## A.2. Der Einfluss von VEGF auf die Sprouting-Angiogenese.

Durch die folgenden Untersuchungen sollte getestet werden, welchen Einfluss VEGF auf die gezeigte Sprouting-Angiogenese im Aortic Ring Assay nimmt.

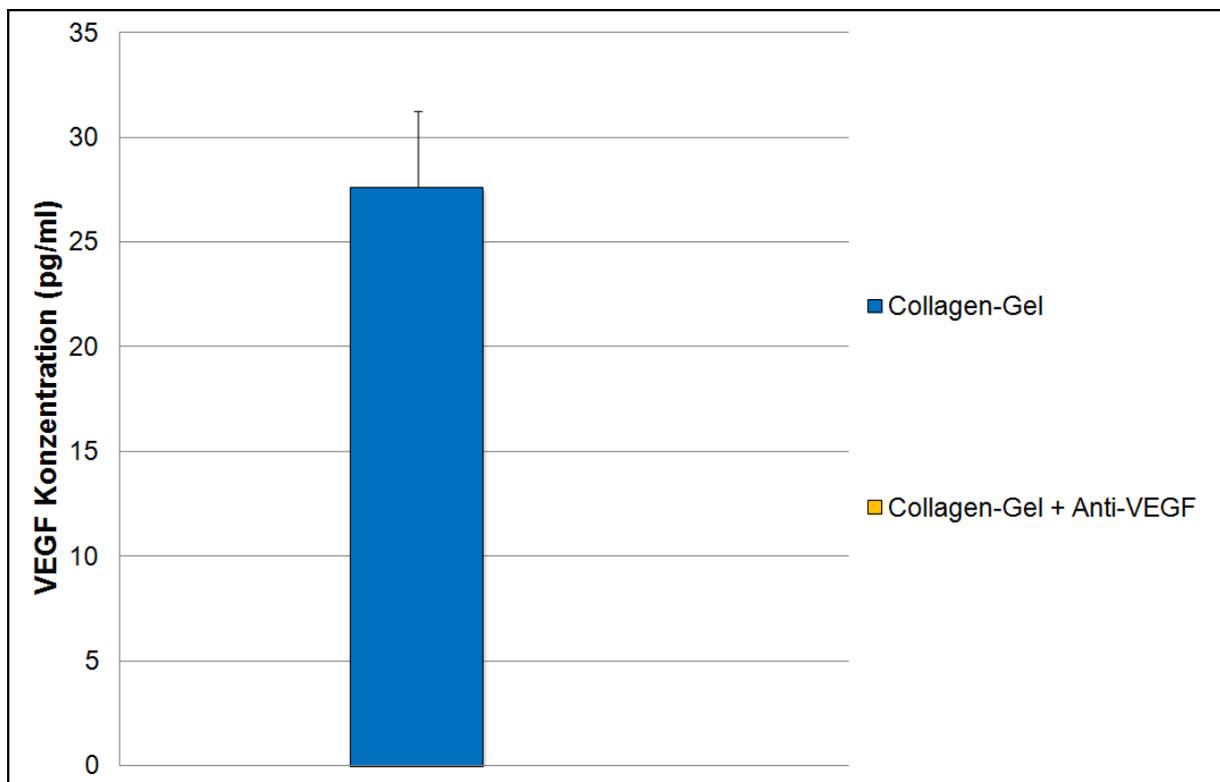
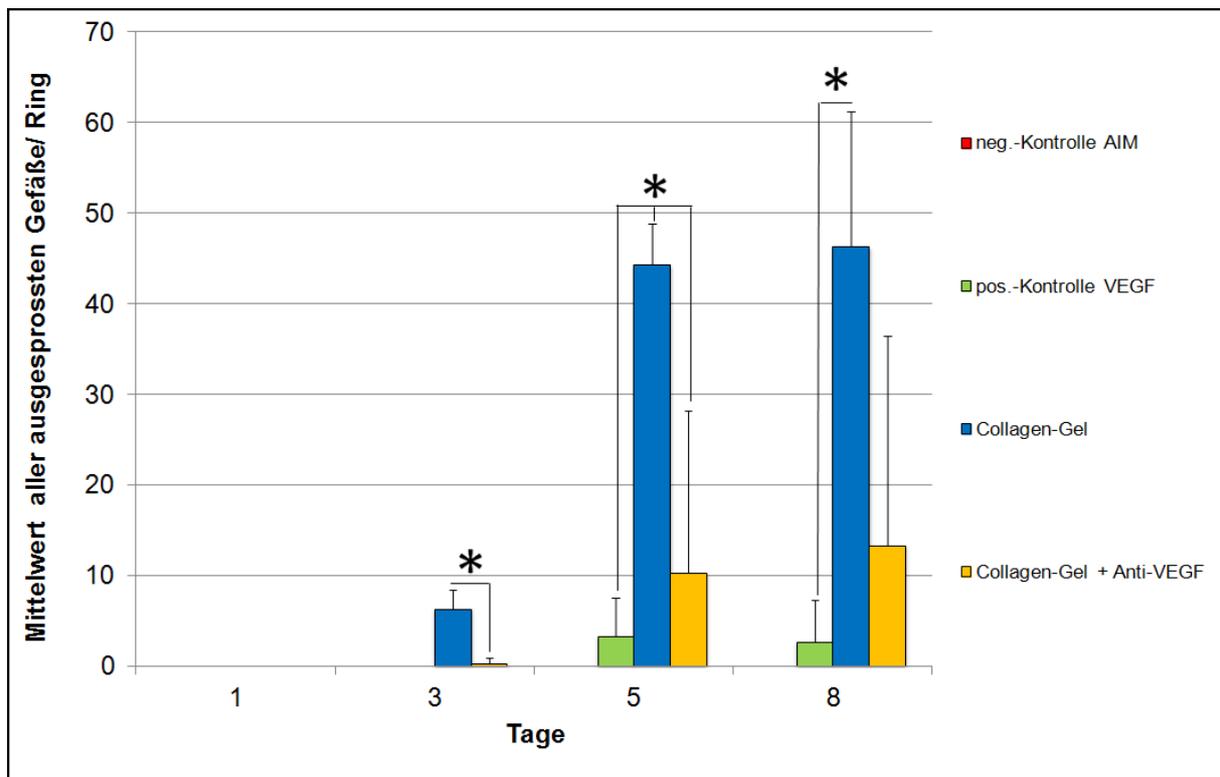


Abb. 9.: ELISA: VEGF; (\* =  $p < 0,05$ )

Hierfür wurde zuerst untersucht, ob der gewählte Antikörper in der Lage ist, VEGF zu blockieren (s. Abb. 9.).

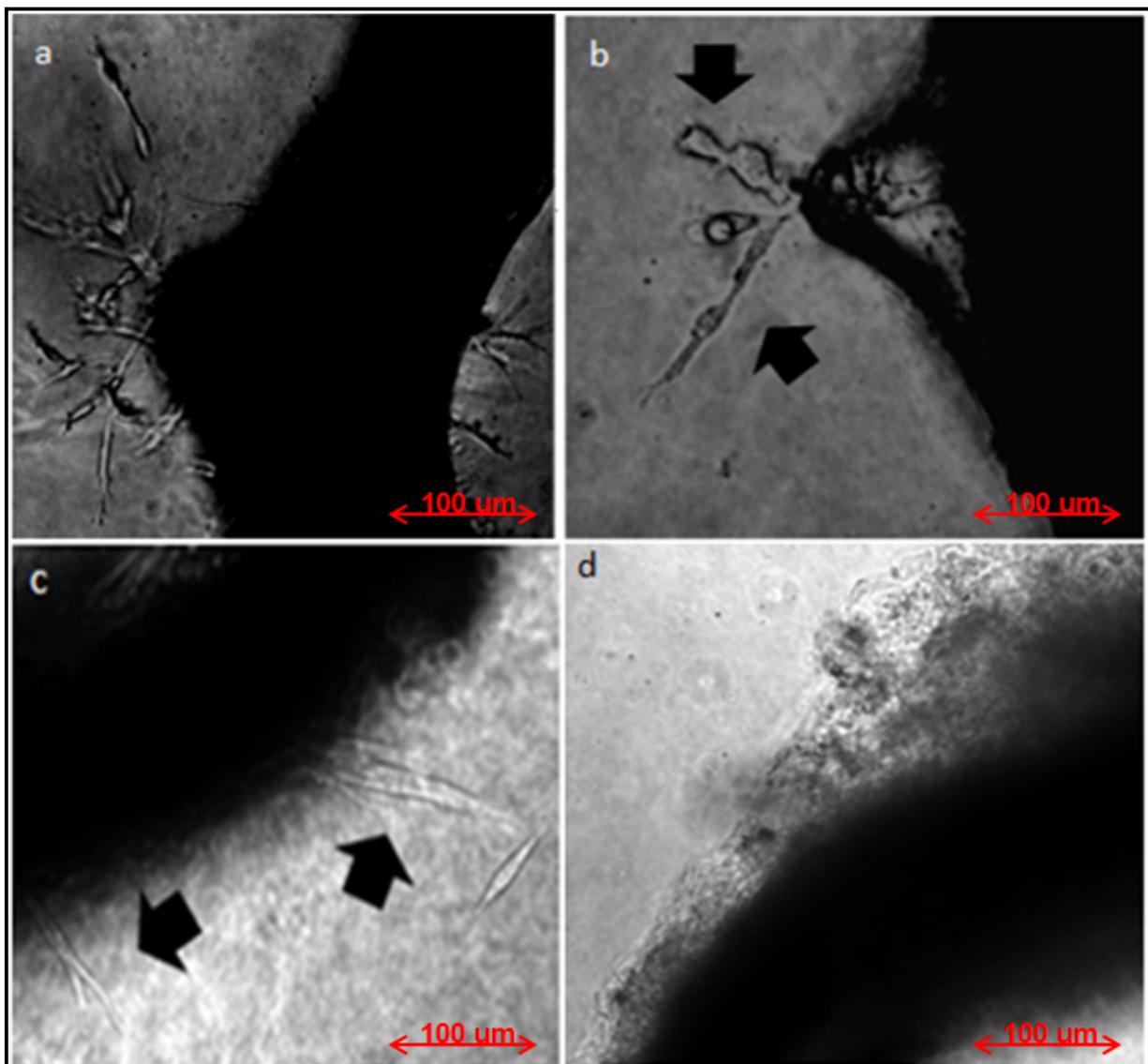
Auf der y-Achse ist die VEGF-Konzentration in pg/ml aufgetragen. Collagen-Gel-Releasate ohne Antikörper-Blockierung zeigte die VEGF-Konzentration, die von PBZ's produziert und mittels Collagen-Gel-Matrix aufgenommen und wieder abgegeben wurde. In der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate, mit dem Zusatz des Antikörpers, konnte durch die quantitative Proteinbestimmung hingegen keine VEGF nachgewiesen werden. Durch dieses ELISA-Ergebnis ist also davon auszugehen, dass die Antikörper-Blockierung von VEGF erfolgreich war.

Durch die erfolgreiche Antikörper-Blockierung (s. Abb. 9.) konnten im zweiten Schritt Collagen-Gel-Releasate und Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate miteinander verglichen werden (s. Abb. 10.). Die folgenden Ergebnisse wurden im gleichen Versuchsaufbau, wie bereits in Abb. 6. gezeigt, gewonnen.



**Abb. 10.:** Collagen-Gel-Releasate vs. Collagen-Gel + Anti-VEGF Releasate;  
 (\* =  $p < 0,05$ )

Während die beiden Kontrollgruppen am dritten Tag keine Sprouting-Angiogenese zeigten, zeigte sich jedoch bereits eine 3-fach größere Anzahl an ausgesprosten Gefäßen in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate (s. Abb. 11.a) zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate mit blockiertem VEGF (s. Abb. 11.b). Dieser Unterschied wurde mit einer Signifikanz von  $p=0,0086$  beobachtet. Aber es fiel auf, dass Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate am dritten Tag Gefäßausprossung zeigte, während die positiv-Kontrolle VEGF gefäßfrei blieb. Am fünften Tag konnte weiterhin keine Gefäßausprossung für die negativ-Kontrolle AIM beobachtet werden.



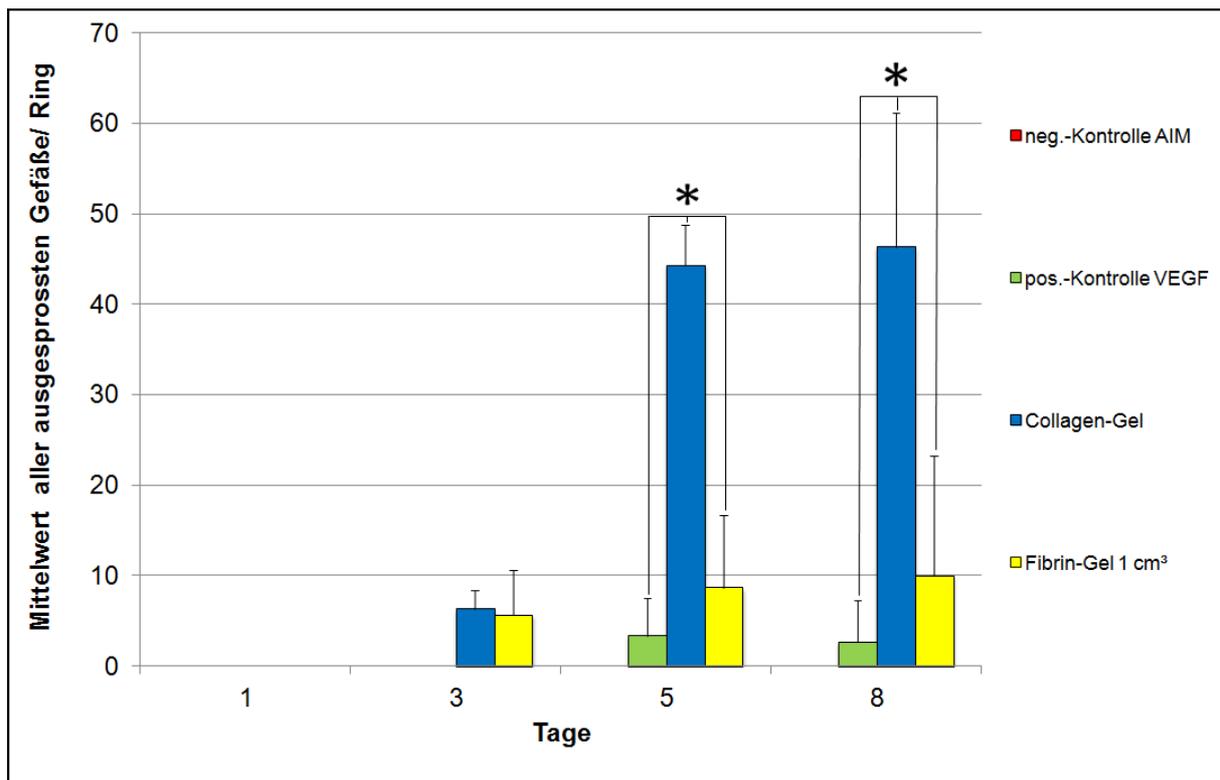
**Abb. 11.a)** Collagen-Gel-Releasate; **11.b)** Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate;  
**11.c)** pos.-Kontrolle VEGF; **11.d)** neg.-Kontrolle AIM

Die positiv-Kontrolle VEGF (s. Abb. 12.c) bildete erstmalig Gefäßausprossung, mit signifikanten Unterschied zu Collagen-Gel-Releasate ( $p=0,0003$ ). Im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate bildete VEGF im Mittelwert weniger Gefäßausprossungen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Der Abstand der beiden Untersuchungsgruppen Collagen-Gel-Releasate und Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate vergrößerte sich. Die Anzahl der Ausprossungen stieg um etwa das 4-fache. Der Unterschied zwischen diesen Untersuchungsgruppen war an diesem Beobachtungstag signifikant ( $p=0,0332$ ). Am achten Beobachtungstag blieb die negativ-Kontrolle AIM, wie über den gesamten Beobachtungszeitraum, ohne Gefäßausprossung (s. Abb. 11.d). Der Unterschied zwischen Collagen-Gel-Releasate und der positiv-Kontrolle VEGF war auch am achten Beobachtungstag signifikant ( $p=0,0082$ ). Collagen-Gel-Releasate mit blockiertem VEGF hat mehr als doppelt so viele Gefäße im Mittelwert, wie die positiv-Kontrolle VEGF, welche auch leicht zum vorherigen Beobachtungstag zugenommen hatte. Auch hier konnte, wie schon am fünften Beobachtungstag, kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden. Es blieb außerdem bei einer 3-4-fach höheren Anzahl an ausgesprossenen Gefäßen in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel + Anti-VEGF-Releasate. Beide Untersuchungsgruppen zeigten am letzten Beobachtungstag einen steigenden Zuwachs. Der Unterschied war jedoch nicht, wie am vorherigen Beobachtungstag, signifikant.

### **A.3. Der Einfluss der extrazellulären Matrix (Collagen-Gel, Fibrin-Gel) auf die Sprouting-Angiogenese, nach Speicherung und Freisetzung parakriner Proteine.**

In der folgenden Analyse wird getestet, ob die Verwendung der unterschiedlichen extrazellulären Matrices Einfluss auf das Sprouting-Ergebnis nehmen. Das Matrix-System könnte auch in einer Art Wundauflage genutzt werden. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in dem gleichen Versuchsaufbau, wie bereits in Abb. 7. und Abb. 11. dargestellt, gewonnen. Die Analyse (s. Abb. 12.) zeigte am dritten Tag keine

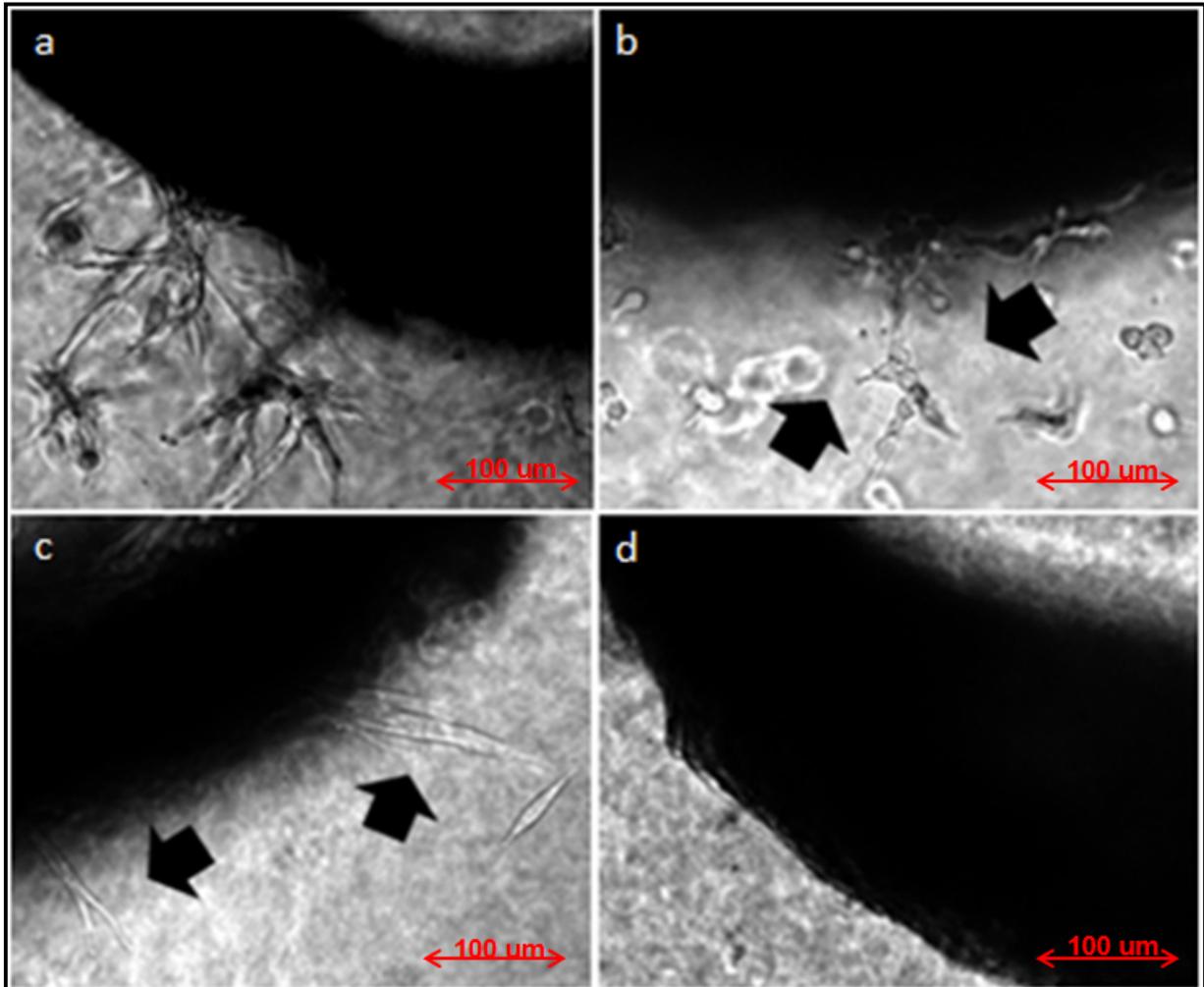
Gefäßausprossung in den beiden Kontrollgruppen. Zudem keinen Unterschied der Mittelwerte zwischen Collagen-Gel-Releasate (s. Abb. 13.a) und Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate (s. Abb. 13.b). Sowohl Collagen-Gel-Releasate als auch Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate zeigten zu einem Zeitpunkt Gefäßstrukturen, zu dem in der positiv-Kontrolle VEGF keine Ausprossung zu erkennen waren. Am fünften Tag zeigte sich keinerlei Gefäßwachstum in der negativ-Kontrolle AIM. Während ein signifikanter Unterschied von Collagen-Gel-Releasate zur positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0003$ ) beobachtet wurde. Außerdem wurde der Unterschied zwischen Collagen-Gel-Releasate und Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate signifikant ( $p=0,0026$ ). Collagen-Gel-Releasate zeigte eine circa 5-fache höhere Anzahl an Gefäßausprossung als Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate. Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate war der positiv-Kontrolle VEGF (s. Abb. 13.c) ebenfalls im Mittelwert, jedoch nicht statistisch signifikant, überlegen.



**Abb. 12.:** Collagen-Gel-Releasate vs. Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate; (\* = $p<0,05$ )

Diese Konstellation änderte sich am achten Tag der Kultivierung nur noch wenig. Die negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 13.d) blieb an diesem Beobachtungstag, wie bereits

zuvor ohne Aussprossung. Alle anderen Untersuchungsgruppen zeigten wenige Gefäßstrukturen mehr, jedoch das Verhältnis zueinander blieb ähnlich. Collagen-Gel-Releasate zeigte signifikant mehr Sprouting als Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate ( $p=0,0340$ ) und die positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0082$ ).

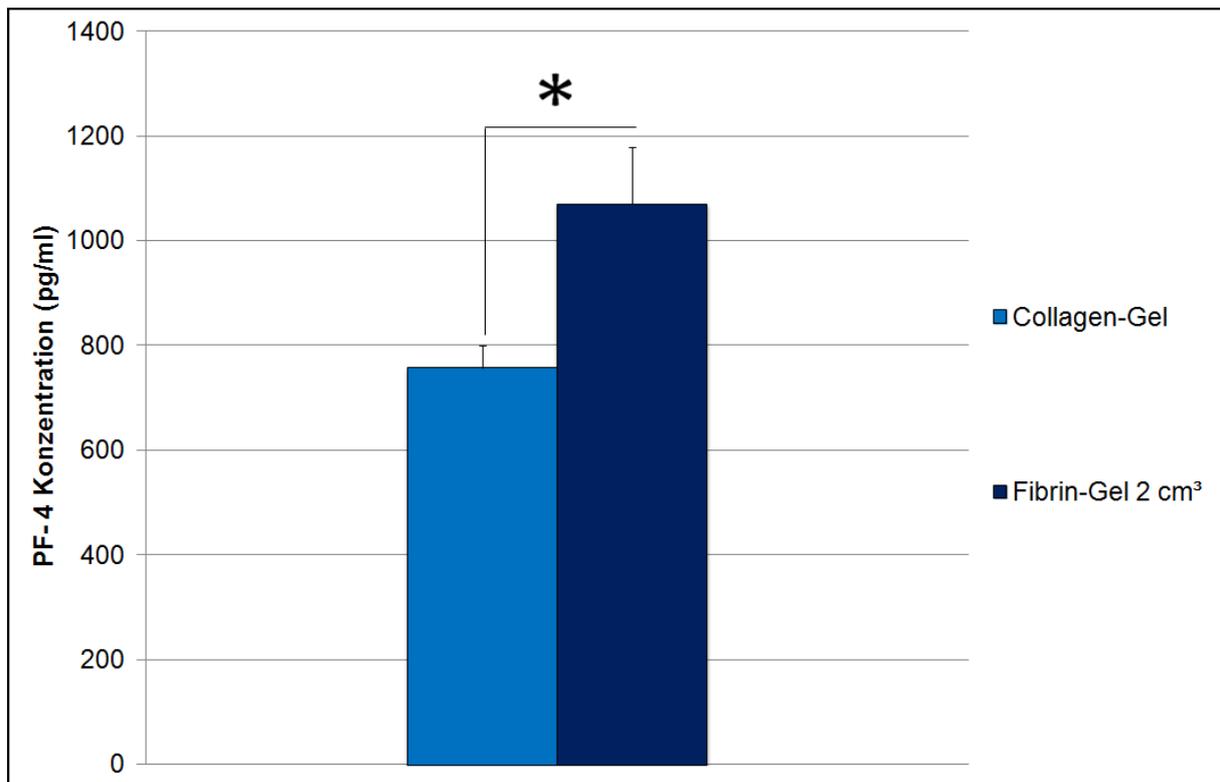


**Abb. 13.a)** Collagen-Gel-Releasate; **13.b)** Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate; **13.c)** pos.-Kontrolle VEGF; **13.d)** neg.-Kontrolle AIM

Im nächsten Schritt wurde untersucht, weshalb die verschiedenen Matrices unterschiedlich gute Sprouting-Angiogenese induzierten. Unter der Hypothese, dass eine unterschiedliche Bindung von anti-angiogenen Faktoren an die Matrix die Ursache für die gezeigten Unterschiede sei, wurde exemplarisch für die Gruppe der

anti-angiogenen Faktoren eine quantitative Proteinbestimmung von PF-4 durchgeführt.

Die Quantifizierung von PF-4 in den Untersuchungsgruppen Collagen-Gel-Releasate und Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate (s. Abb. 14.) ergab eine signifikant niedrigere PF-4 Konzentration in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate ( $p=0,0017$ ). Die PF-4 Konzentration wurde in der Einheit pg/ml gemessen. Eine Korrektur aufgrund von Volumenunterschieden war nicht notwendig, da beide Untersuchungsgruppen das gleiche Volumen besaßen. Darin liegt auch die Begründung, weshalb Collagen-Gel-Releasate mit der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate verglichen wurde und nicht mit der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate, die im Aortic Ring als Vergleich diente.

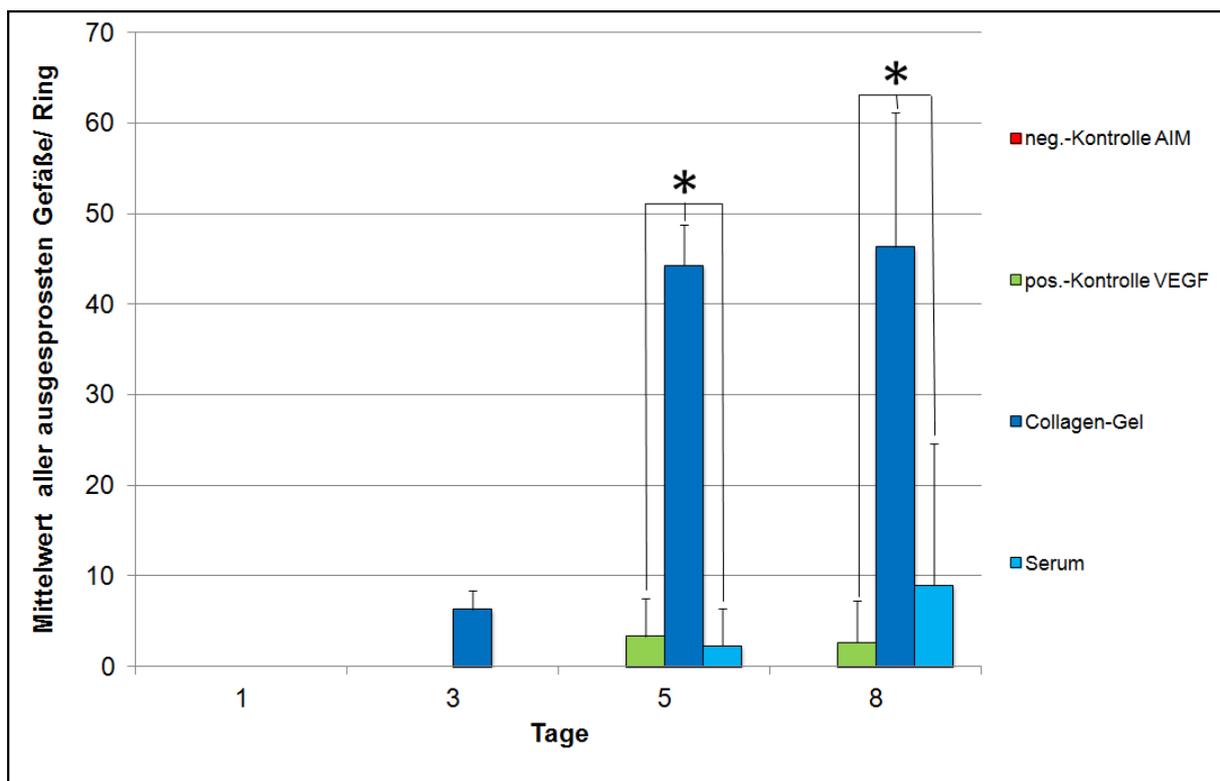


**Abb. 14.:** ELISA PF-4: Collagen-Gel-Releasate vs. Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate;  
(\* =  $p < 0,05$ )

#### A.4. Der Einfluss einer erhöhten Konzentration von PF-4 auf die Sprouting-Angiogenese.

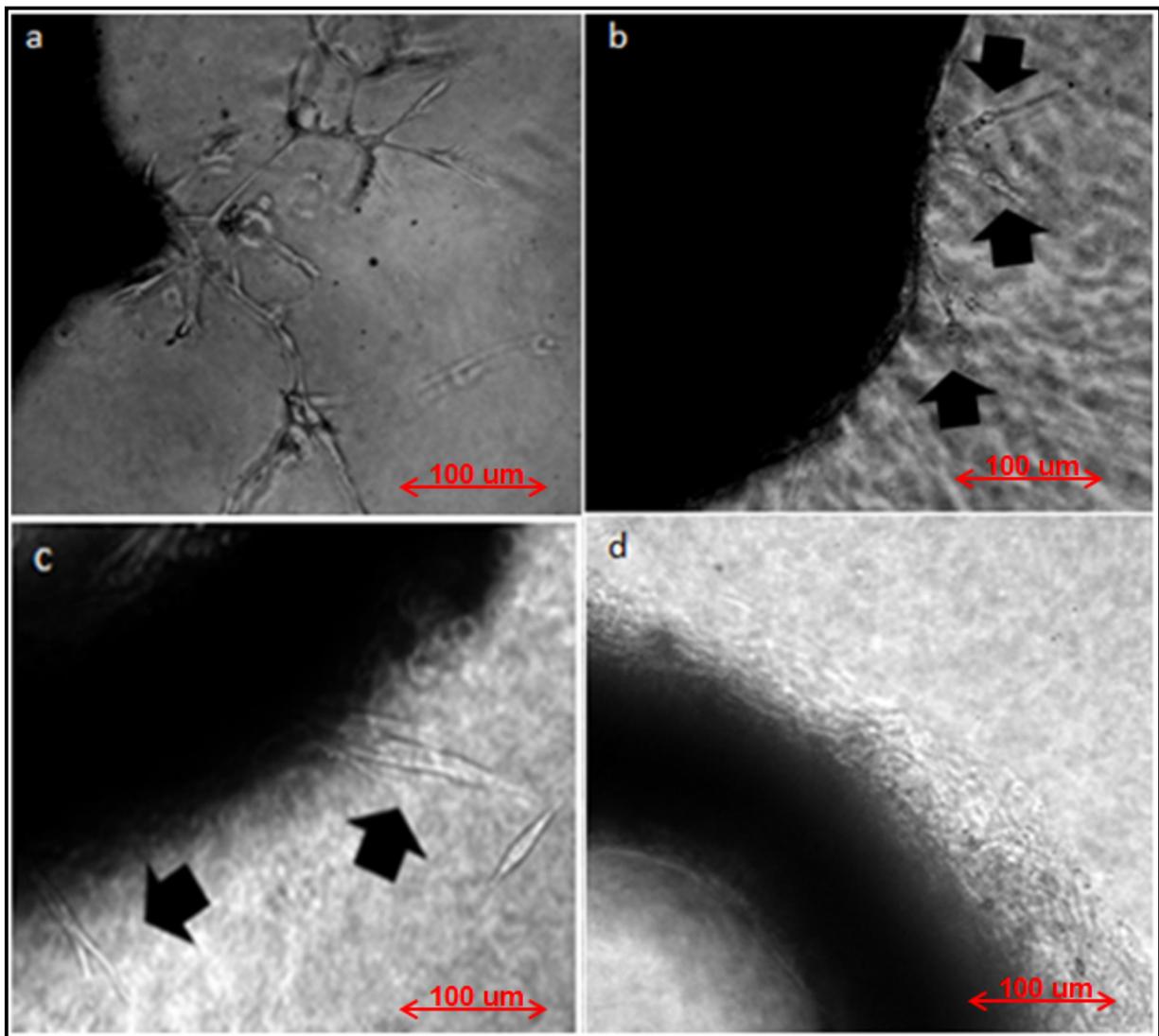
Das PF-4 eine anti-angiogene Wirkung besitzt, sollte durch die Untersuchung einer PF-4 haltigen Untersuchungsgruppe bestätigt werden. Für diese PF-4-haltige Untersuchungsgruppe wurde Serum verwendet. Auch diese Ergebnisse wurden zusammen mit den oben erwähnten Ergebnissen im gleichen Versuchsaufbau gewonnen.

Die Analyse (s. Abb. 15.) zeigte bereits am dritten Tag, während die negativ-Kontrolle AIM, als auch die positiv-Kontrolle VEGF (s. Abb. 16.c), sowie die Untersuchungsgruppe Serum keine Gefäße zeigten, eine steigende Anzahl an ausgesprosten Gefäßen in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate (s. Abb. 16.a).



**Abb. 15.:** Collagen-Gel-Releasate vs. Serum; (\* = $p < 0,05$ )

Am fünften Beobachtungstag wies die negativ-Kontrolle AIM keine Veränderung, hinsichtlich seiner Fähigkeit Sprouting-Angiogenese zu erzeugen auf. Die positiv-Kontrolle VEGF bildete erstmalig am fünften Beobachtungstag Gefäße. Serum (s. Abb. 16.b) erzeugte eine ähnliche Anzahl an Sproutings wie die positiv-Kontrolle VEGF. Collagen-Gel-Releasate hatte weiteren Zuwachs an Aussprossungen. Sodass sich ein signifikanter Unterschied zur Untersuchungsgruppe Serum ( $p=0,0003$ ) und der positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0003$ ) (s. Abb. 16.c) ergab.



**Abb. 16.a)** Collagen-Gel-Releasate; **16.b)** Serum; **16.c)** pos.-Kontrolle VEGF; **16.d)** neg.-Kontrolle AIM

Die negativ-Kontrolle AIM bildete auch am achten Beobachtungstag keine Gefäße. Im Vergleich zum fünften Beobachtungstag konnte die Untersuchungsgruppe Serum etwas mehr Gefäßstrukturen erzeugen. Serum war sogar, anders als zum vorherigen Beobachtungstag, im Mittelwert etwas stärker als die positiv-Kontrolle VEGF. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Collagen-Gel-Releasate war weiterhin die Untersuchungsgruppe mit der größten Anzahl an Aussprossungen. Die Anzahl hatte sich abermals vergrößert. Der Unterschied war weiterhin signifikant zur Untersuchungsgruppe Serum ( $p=0,0082$ ) und zur positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0082$ ).

### A.5. Die extrazelluläre Matrix Fibrin nimmt Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese.

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie sich das angiogene Potential von parakrinen Proteinen, die aus einem Fibringerinnsel (Fibrin Clot) freigelassen werden, darstellt,

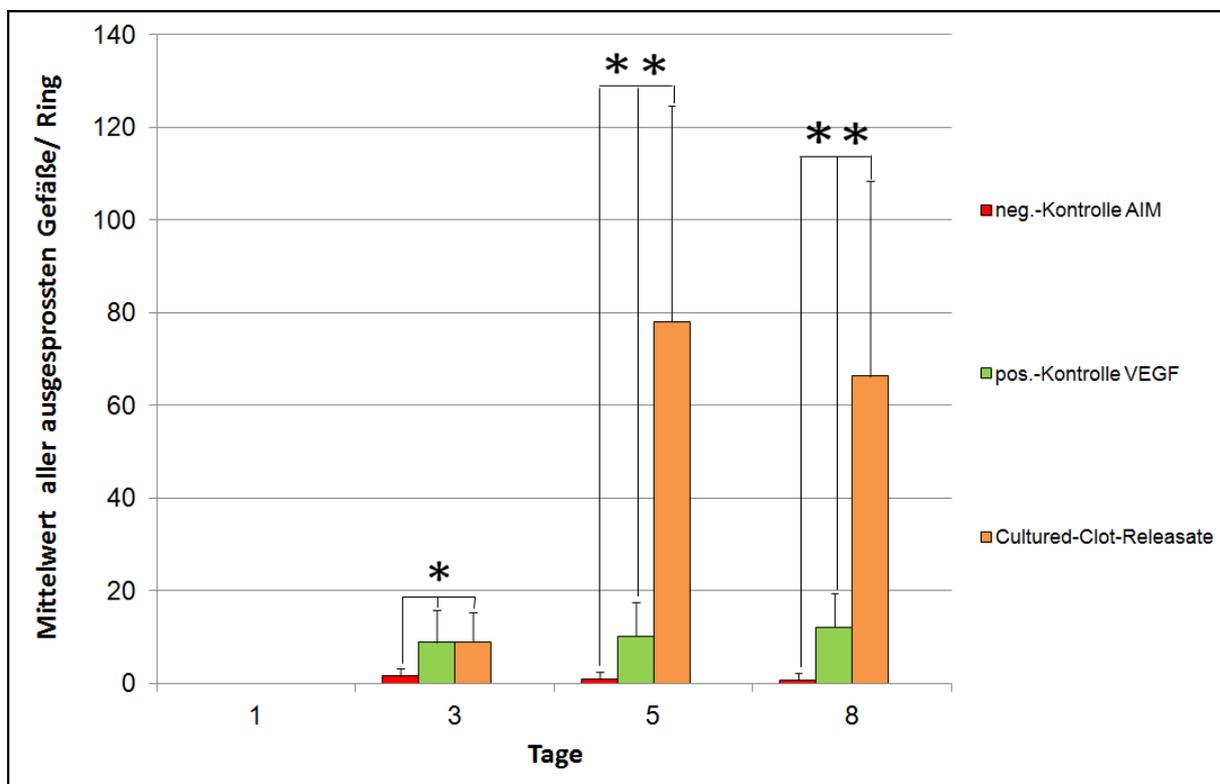
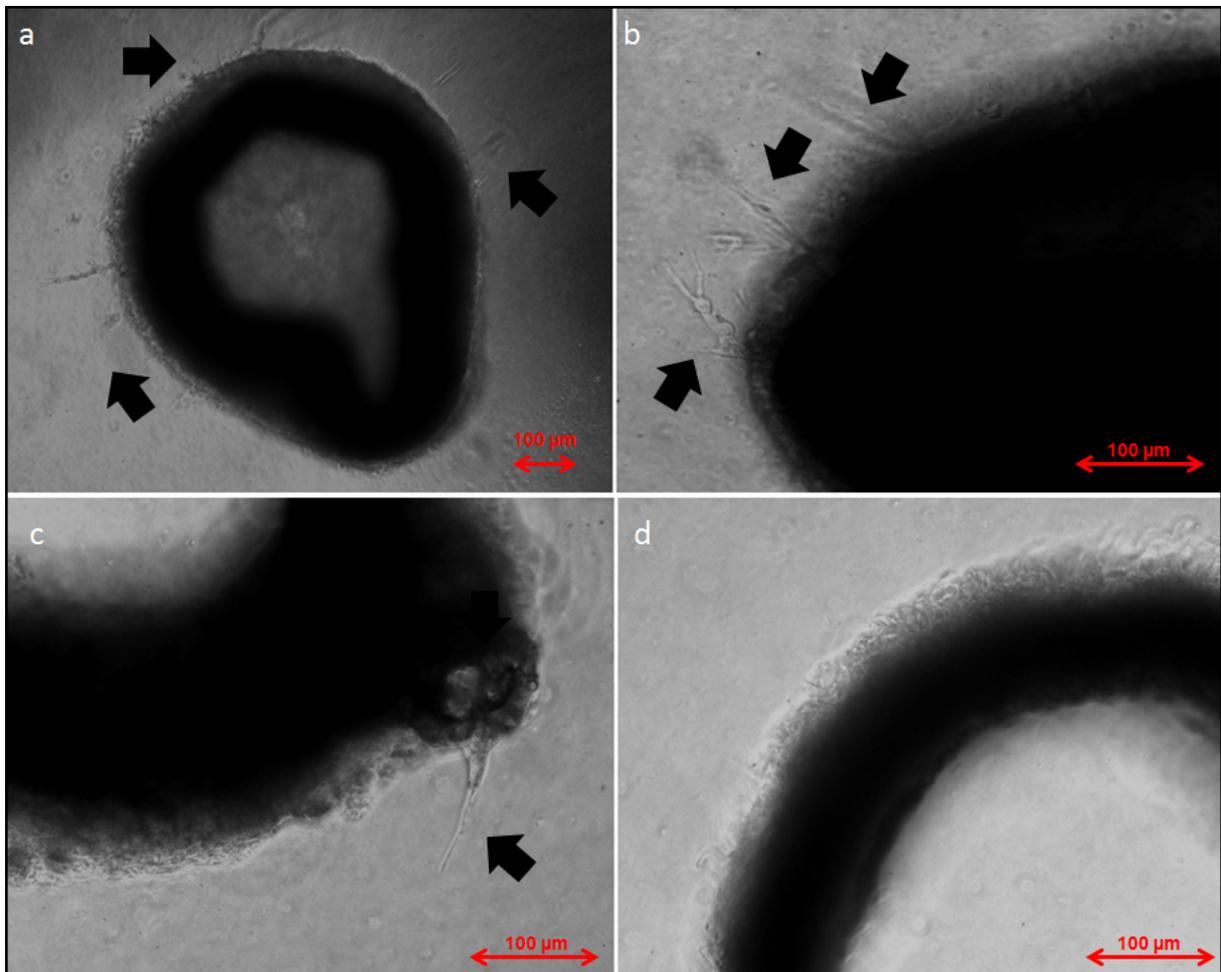


Abb. 17.: Cultured-Clot-Releasate vs. VEGF

wurde im ersten Schritt die Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate getestet (s. Abb. 17.). Dieses Releasate aus einem natürlichen Fibringerinnsel wurde in einer Art Wundsimulation gewonnen.

Am dritten Beobachtungstag zeigte die negativ-Kontrolle AIM einzelne Sproutings, jedoch signifikant weniger als die positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0039$ ) und die Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate ( $p=0,0024$ ).

Die Anzahl an Sproutings der negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 18.d) änderte sich nicht wesentlich am fünften Beobachtungstag. Es wurde weiterhin ein signifikanter Unterschied zur positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0009$ ) beobachtet.



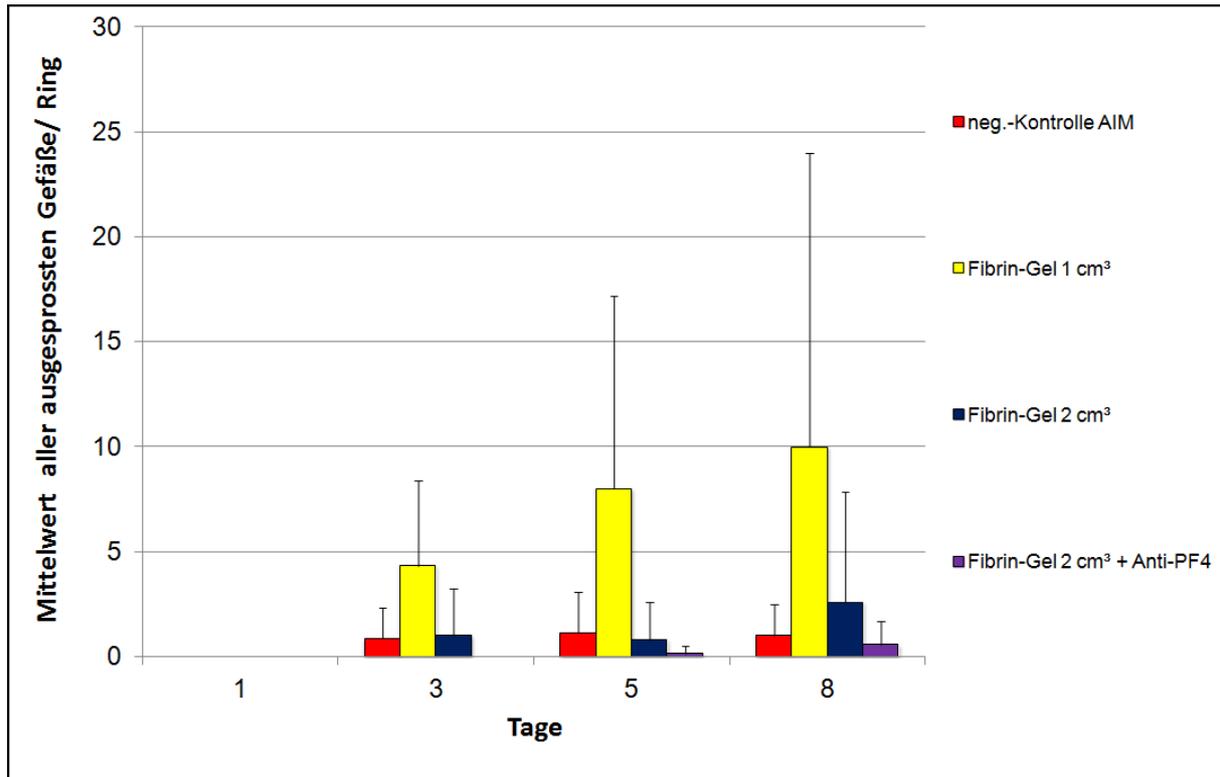
**Abb. 18.a+b)** Cultured-Clot-Releasate; **18.c)** pos.-Kontrolle AIM; **18.d)** neg.-Kontrolle AIM

Die positiv-Kontrolle VEGF (s. Abb. 18.c) zeigte eine unveränderte Anzahl an Sproutings. Die Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate (s. Abb. 18.a und 18.b) induzierte jedoch eine größere Anzahl an neu ausgesprossenen Gefäßen. Dies hatte einen signifikanten Unterschied sowohl zur negativ-Kontrolle AIM ( $p=0,0001$ ) als auch zur positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0002$ ) zur Folge.

Diese Konstellation änderte sich am achten Beobachtungstag nicht mehr erheblich. Die negativ-Kontrolle AIM wies unverändert die wenigsten Aussprossungen auf und unterschied sich signifikant zur positiv-Kontrolle VEGF ( $p=0,0001$ ) und der Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate ( $p=0,0001$ ). Der am vorherigen Beobachtungstag ermittelte Unterschied zwischen der positiv-Kontrolle VEGF und der Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate blieb bis zum Ende der Untersuchung signifikant ( $p=0,0008$ ).

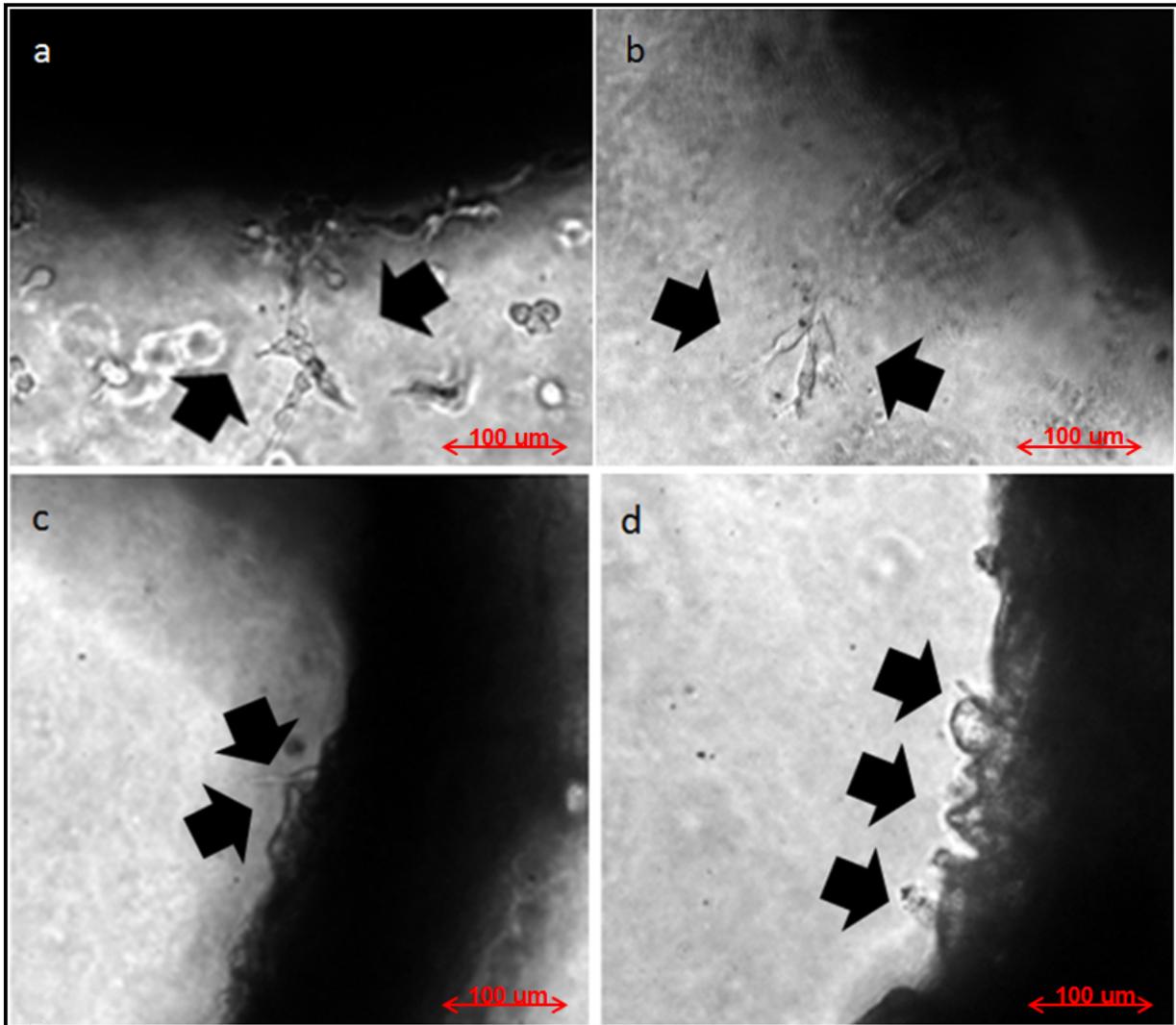
Während der Untersuchung im ersten Teil dieser Arbeit, indem die Matrices auf ihre Fähigkeit getestet wurden, Sprouting-Angiogenese zu erzeugen, fiel in unveröffentlichten Ergebnissen auf, dass Fibrin in unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedliche Sprouting-Ergebnisse vorwies. Daraufhin wurden weitere Untersuchungen, basierend auf den Kenntnissen der Vorergebnisse, durchgeführt. Da die Vorergebnisse ebenfalls den Verdacht darauf lenkten, dass Fibrin-Gel schlechteres Sprouting zeigte, weil es vermehrt anti-angiogene Faktoren, wie z.B. PF-4, band wurde eine Untersuchungsgruppe mit PF-4-Blockierung getestet.

Diese Ergebnisse aus Abb. 19 wurden in einem Versuchsaufbau mit den in Abb. 18. präsentierten Ergebnissen erworben.



**Abb. 19.:** Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate vs. Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate vs. Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate

Die negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 20.d) zeigte am dritten Beobachtungstag wenig Sprouting-Angiogenese. Es wurde ähnlich viel Wachstum wie in der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate detektiert. Der Vergleich der Mittelwerte von Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate, Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate sowie Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit PF-4-Blockierung, unter sichergestellter Blockierung durch die Proteinquantifizierung (s. Abb. 23.), bemerkte man bereits am dritten Beobachtungstag einen, jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikanten Unterschied der beiden unterschiedlichen Fibrin-Konzentrationen (s. Abb. 19.).



**Abb. 20.a)** Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate; **20.b)** Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate; **20.c)** Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate; **20.d)** neg.-Kontrolle AIM

Die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate (s. Abb. 20.a) war der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate (s. Abb. 20.b) im Mittelwert, jedoch nicht signifikant, überlegen. Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit PF-4-Blockierung zeigte keinerlei Gefäßsproutings (s. Abb. 20.c).

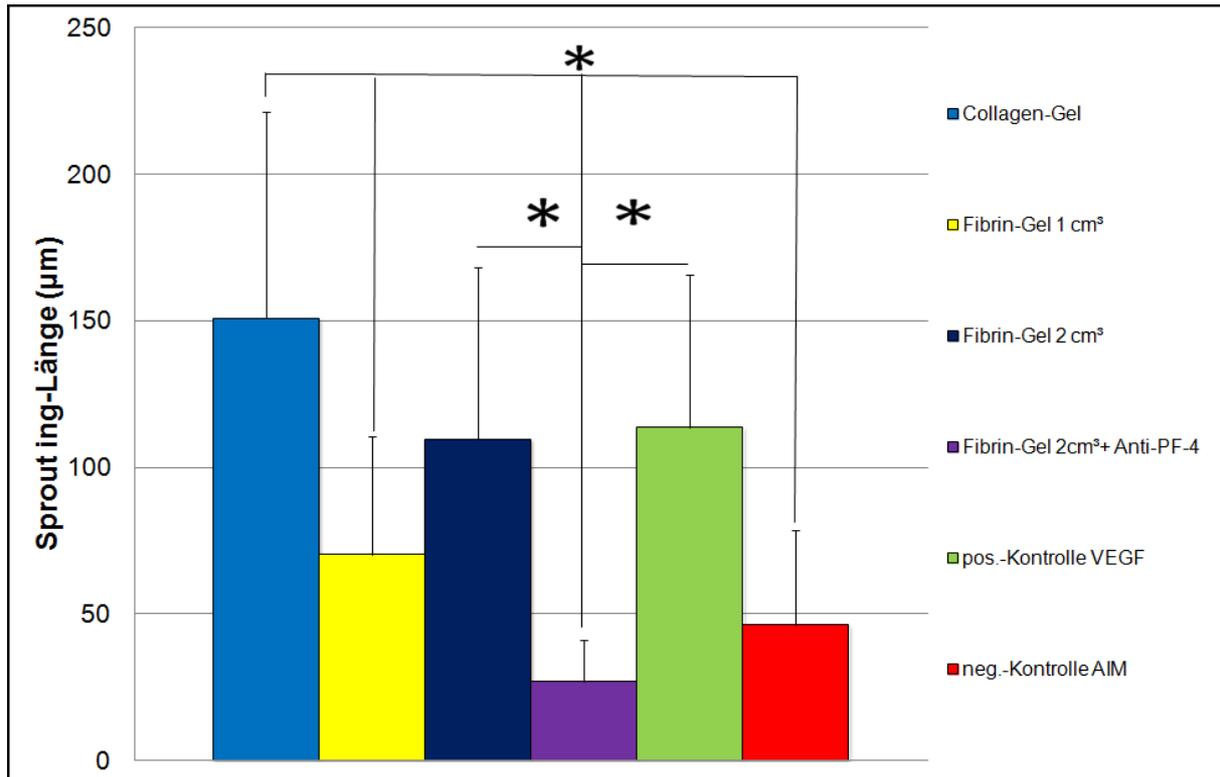
Während am fünften Beobachtungstag in der negativ-Kontrolle AIM ähnlich viele Sproutings wie am vorherigen Beobachtungstag entdeckt werden konnten, präsentierte die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit PF-4-Blockierung erstmals einige Sproutings. Jedoch weiterhin weniger als die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate. Die Gefäßanzahl in der

Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate war wiederum mehr geworden. Der Abstand der Mittelwerte vergrößerte sich zu allen anderen Untersuchungsgruppen. Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Am achten Beobachtungstag bildete die negativ-Kontrolle AIM zum Abschluss des Versuches ähnlich viele Gefäße wie schon an den vorherigen Beobachtungstagen. Bei der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate steigerte sich die Anzahl weiter und lag in der Rangfolge weit vor der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate. Die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit blockiertem PF-4 hatte zwar etwas mehr Gefäße gebildet, blieb dennoch weiter die Untersuchungsgruppe mit dem geringsten Wachstum. Die Unterschiede waren weiterhin nicht signifikant. Interessanterweise besaß Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate im Mittelwert konstant weniger Gefäße, als Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate. Ebenfalls interessant war die Beobachtung, dass trotz der Blockierung eines anti-angiogenen Faktors wie PF-4, das Sprouting schlechter ausfiel als in Anwesenheit des anti-angiogenen Faktors.

Da während der Auswertung der Sprouting-Ergebnisse Unterschiede in der Länge der einzelnen Sproutings auffällig wurden, wurde zusätzlich zur Anzahl an Sproutings die Länge der Sproutings, gemessen in µm, quantifiziert (s. Abb. 22.).

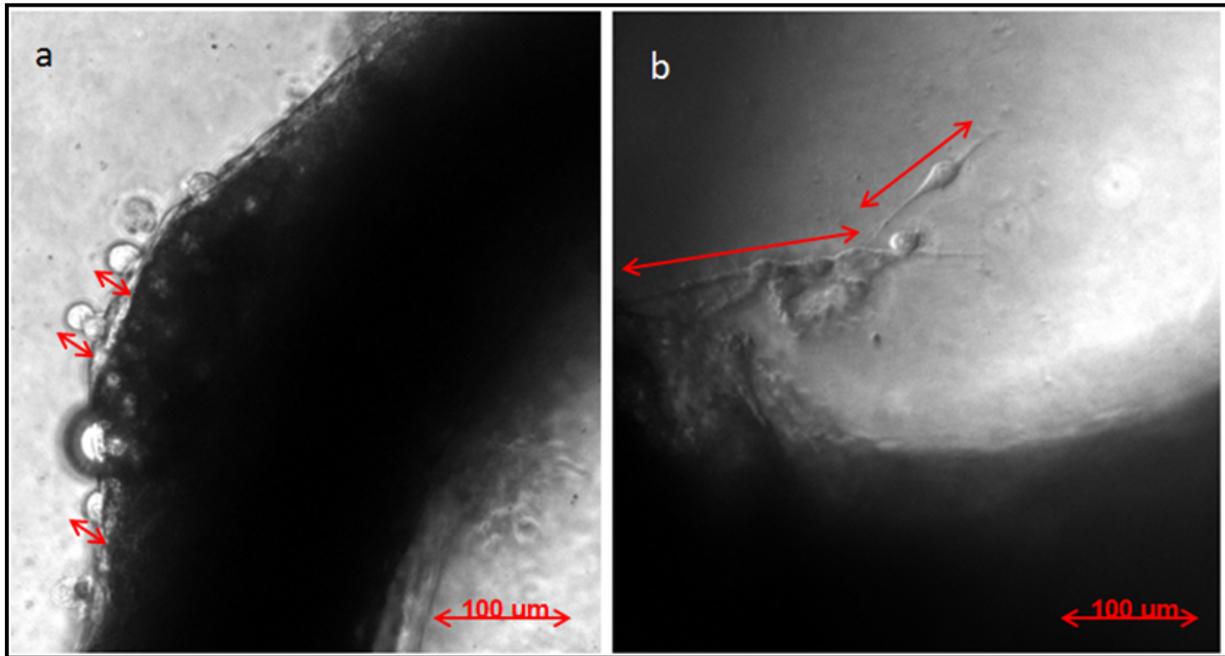
Die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate, die in der Anzahl an Sproutings der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate überlegen war, präsentierte, jedoch nicht statistisch signifikante, kürzere Aussprossungen als die oben genannte Untersuchungsgruppe. Auffälliger war jedoch, dass die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate die längsten Aussprossungen aller getesteten Fibrin Untersuchungsgruppen zeigte.



**Abb. 21.:** Quantifizierung der Sprouting-Länge in µm; (\* = $p < 0,05$ )

Ein besonderes Augenmerk lag außerdem darauf, dass Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate signifikant längere Sprouting-Ergebnisse zeigte als die Untersuchungsgruppe mit blockiertem PF-4 ( $p=0,0044$ ), die als schlechteste von allen Untersuchungsgruppen registriert wurde. Dieser signifikante Unterschied war bereits mit bloßem Auge (s. Abb. 22.) zu erahnen. Selbst die negativ-Kontrolle AIM bildete längere Sprouting's, als die Kondition in der ein anti-angiogener Faktor blockiert wurde. Dieser Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Betrachtete man einmal nicht die Fibrin Untersuchungsgruppen untereinander so sah man das die Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate statistisch signifikant längere Aussprossungen besaß als die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate ( $p=0,0031$ ), die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate ( $p=0,0004$ ) und auch die negativ-Kontrolle AIM ( $p=0,0017$ ). Außerdem waren in der positiv-Kontrolle VEGF signifikant längere Sproutings zu finden als in der negativ-Kontrolle AIM ( $p=0,0215$ ) und der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate ( $p=0,0029$ ).



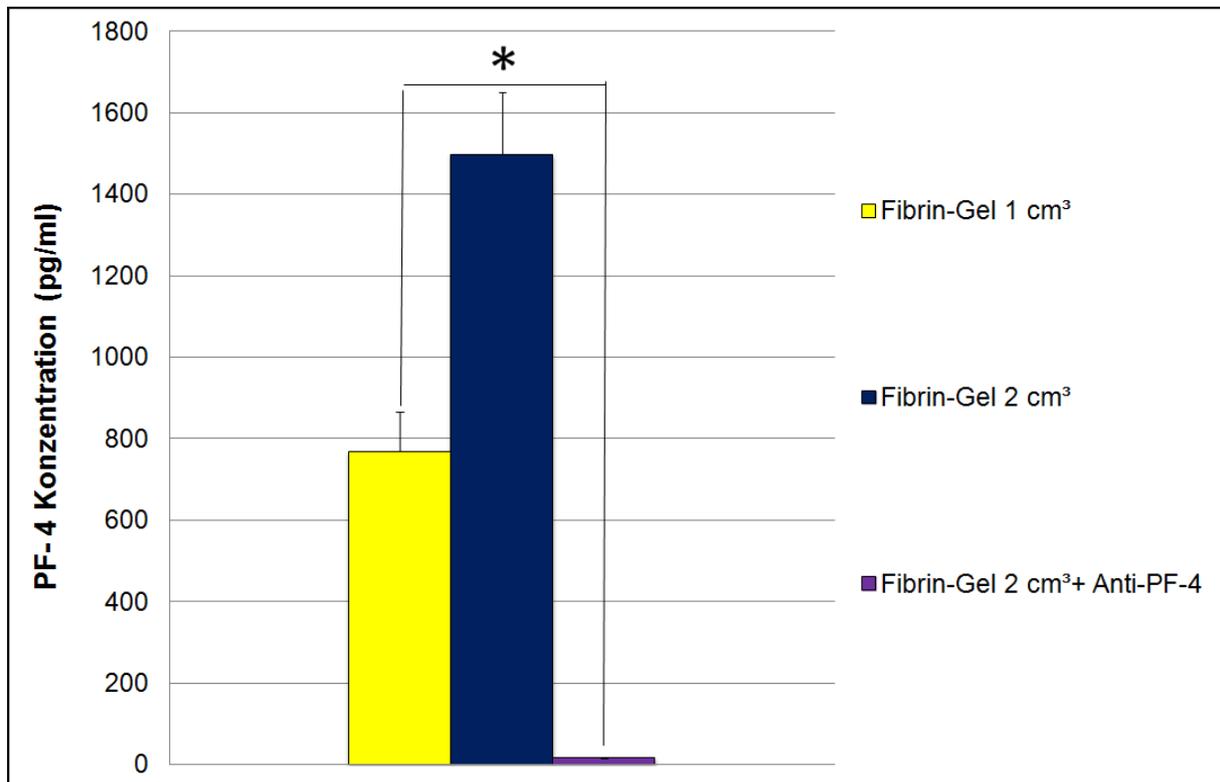
**Abb. 22.a)** Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate; **22.b)** Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate

### **A.6. Die Fähigkeit der extrazellulären Matrix Fibrin parakrine Proteine zu binden.**

Die Proteinquantifizierung von PF-4 wurde durchgeführt, um eine erfolgreiche Blockierung des Faktors PF-4 sicherzustellen (s. Abb. 23.). Ebenfalls wurden die PF-4-Konzentrationen der unterschiedlichen Fibrin-Konzentrationen bestimmt, da die anti-angiogenen Faktoren verdächtigt wurden, für den oben beschriebenen Effekt verantwortlich zu sein.

In der vertikalen Achse ist der Angiogenesefaktor PF-4 in der Konzentration von pg/ml aufgetragen. In diesem Vergleich wurde die durch die unterschiedliche Fibrin-Matrixvolumen bedingte Verdünnung für die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit dem Faktor 1,4 korrigiert. Dieser Verdünnungsfaktor wurde wie folgt berechnet: Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>, verdünnt in 1,5 ml AIM ergab ein Volumen von 3,5 ml. Während Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>, ebenfalls in 1,5 ml AIM verdünnt, ein Volumen von 2,5 ml ergab. Teilte man nun das Volumen von Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> = 3,5 ml und das Volumen von Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> = 2,5 ml, erhielt man einen Verdünnungsfaktor von 1,4. Dieser korrigierte Wert von Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate zeigte die höchste Konzentration von

PF-4. Der Unterschied zu Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate zeigte sich signifikant ( $p=0,0015$ ). Ebenso zeigte Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate signifikant weniger PF-4 als Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate ( $p=0,0011$ ), jedoch auch signifikant mehr, als das Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit Antikörper-Blockierung von PF-4 ( $p=0,0001$ ).



**Abb. 23.:** ELISA: PF-4; (\* =  $p < 0,05$ )

In der Untersuchungsgruppe mit PF-4-Blockierung war die Konzentration von PF-4 annähernd null, was die erfolgreiche Blockierung von PF-4 bewies. Die PF-4-Konzentration der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate ist annähernd doppelt so hoch wie die der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate. Es ist festzuhalten, dass ein höheres Volumen an Fibrin vermehrt PF-4 bindet und wieder abgibt.

## VI. Diskussion

### A. Diskussion von Material und Methoden

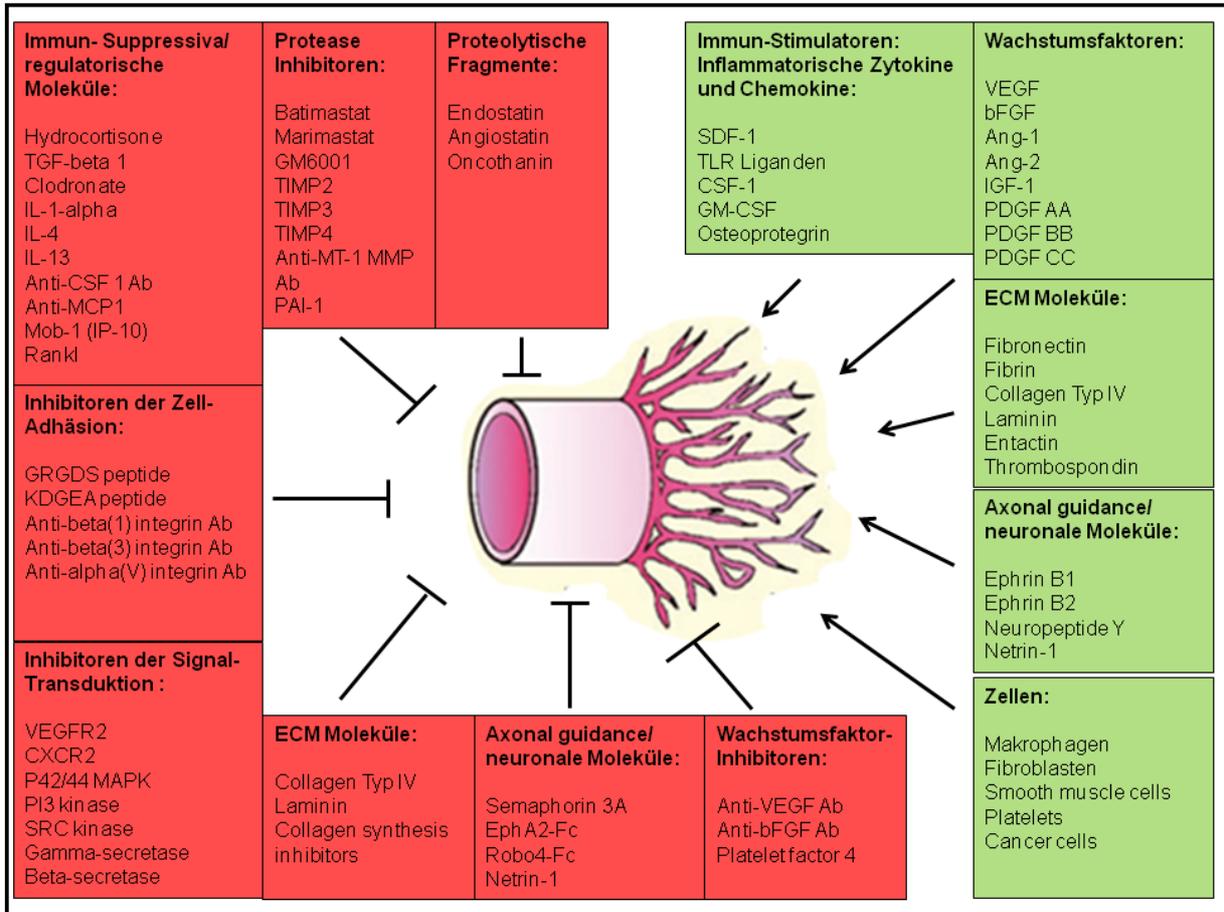
In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung des parakrinen Potentials von hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen der Aortic Ring Assay verwendet. Der Aortic Ring Assay ist eine geeignete Methode für Studien zur Sprouting-Angiogenese und zum Verständnis der dahinterstehenden Basis-Mechanismen [84]. Auch der Einfluss von pro- und anti-angiogenen Wachstumsfaktoren kann in diesem Modell zufriedenstellend untersucht werden [84].

Das Aussprossen von neuen Gefäßen ist in der Wundheilung besonders bedeutungsvoll, da die neuen Gefäße Anschluss an das vorhandene Gefäßsystem finden müssen. Durch dieses Modell wird auf eine sehr physiologische Art und Weise die Sprouting-Angiogenese evaluiert und eine Lücke zwischen in vivo- und in vitro-Modellen geschlossen [87]. Die Popularität dieses Modells ist damit zu erklären, dass es leicht zu reproduzieren ist, die Kosten für dieses Modell gering sind, die Handhabung leicht zu erlernen ist und eine gute Korrelationen mit in vivo Studien besteht [87].

Die Geschichte des Aortic Ring Assays begann im Jahr 1982, wo erstmals von Nicosia et al. beobachtet wurde, dass Ringe, präpariert aus einer Ratten-Aorta, die Kapazität besitzen, kleine Gefäße zu entwickeln [88]. Im Laufe der Zeit und mit der Möglichkeit von genetisch veränderten Mausexperimenten wurde die Präparation von Mauseorten populärer. Im Jahre 1989/ 1990 kam eine weitere Entdeckung hinzu: Kawasaki et al. und Nikosia et al. beobachteten, dass die endotheliale Aussprossung aus den präparierten Aorten-Ringen nicht Serum und/ oder auch nicht von exogenen Wachstumsfaktoren abhängig ist, sondern die Aussprossung auch über einen endogenen Mechanismus ablaufen kann, der durch die Präparation und damit verbundener mechanischer Reizung getriggert ist [8, 89]. Dies könnte der Grund sein, weshalb in Abb. 17., Abb. 18., Abb. 19., Abb. 20. und Abb. 21., der hier dargestellten Daten die negativ-Kontrollen AIM Sprouting-Angiogenese gezeigt hatten. Die aortale Angiogenese ist reguliert von endogenen Angiogenesefaktoren, inflammatorischen

Zytokinen, extrazellulären Matrix-Molekülen und proteolytischen Enzymen, die von Zellen der Gefäßwand aufgrund der mechanischen Schädigung während der Präparation, gebildet werden [85]. Auch aus diesem Grund wurde nicht auf die Serum-Starvation der Ringe nach abgeschlossener Präparation verzichtet. Die durch die Präparation initialisierten Vorgänge wurden durch die Serum Starvation abgefangen ohne Einfluss auf die eigentliche Untersuchung zu nehmen. So konnten die Unterschiede in der Präparation der jeweiligen Ringe angeglichen und der daraus resultierende Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese minimiert werden. Die Gefäßstrukturen, die aus dem Aortic Ring heraus sprossen, bestehen aus smooth muscle cells und Perizyten und sind somit anatomisch ähnlich zu Neovessels in vivo [83]. Mehrere angiogene Einflüsse sind bereits speziell in diesem Modell erforscht. In Abbildung 24. werden in Rot einige Stoffe dargestellt, die die Angiogenese in diesem Modell inhibieren und in Grün weitere Stoffe, die sie stimulieren.

Aber auch dieses Modell hat Schwachstellen, die Einfluss auf die Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungsgruppen nehmen können und somit prinzipiell alle gewonnenen Ergebnisse beeinflussen. Diese Schwachstellen sind jedoch unvermeidbar in diesem Versuchsaufbau. Nicht nur die angesprochene mechanische Reizung, sondern auch das Volumen von Medium und der Biomatrix (z.B. Matrigel, Fibrin-Gel, Collagen-Gel), in der die Ringe eingebettet sind, verändern die Intensität der Angiogenese [84]. Die Morphologie der ausgesprossenen Gefäße im Matrigel sind z.B. dünner und spindelartiger im Vergleich zu den robusten Gefäßen, die in einer Fibrin oder Collagen Matrix beobachtet werden [5]. Nichtsdestotrotz wurde Matrigel genutzt, da die Bildqualität der mikroskopischen Aufnahmen hochwertiger war. Durch die hochwertigeren Aufnahmen wurde nicht nur die Mikroskopie, sondern somit auch die Erfassung aller Gefäßaussprossungen erleichtert. Dadurch konnte eine genauere Quantifizierung der Gefäßaussprossungen sichergestellt werden.



**Abb. 24.:** Aus Nicosia, R.F., *The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery* [87].

Die unterschiedliche Präparation jedes einzelnen Ringes führt ebenfalls zu Variationen und nimmt somit Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese [83]. Dies ist nicht gänzlich zu vermeiden. Um jedoch dieser Variation entgegenzuwirken, wurde neben der Serum-Starvation, jede Präparation möglichst standardisiert und im gleichen Setting durchgeführt. Um möglichst exakte Ringgrößen zu erhalten, wurde eine Schablone verwendet. Weitere Überlegungen beschäftigten sich mit dem Design einer standardisierten Schablone auf Basis eines 3D-Ausdrucks, welches das Zuschneiden der Ringe erleichtern soll. Erste Konzepte wurden bereits gedruckt. Ein Test, der

Auskunft über die Handhabung gibt, soll folgen. Denn je größer der Ring ist, desto höher ist die potenzielle Fläche für die Initialisierung von Sprouting-Angiogenese. Auch das Alter der Maus oder die Verwendung von unterschiedlichen Mäusen kann theoretisch Einfluss auf das Ergebnis nehmen [83]. So weisen Studien einen Unterschied zwischen älteren und jüngeren Mäusen, einen Einfluss durch das Alter und durch den genetischen Background auf [83, 85]. Das Ergebnis einer Studie zeigte, dass die angiogene Antwort im Aortic Ring Assay von zehn Monate alten Mäusen auf VEGF etwa 22% niedriger war, im Vergleich zu einem Monat alten Tieren [87, 90]. Um die große Anzahl an Ringen für die Untersuchungsgruppen zu erreichen wurde in dieser Arbeit teilweise die Verwendung von mehreren Mäusen notwendig. Um jedoch eine Vergleichbarkeit zu garantieren, wurde jeweils jeder Untersuchungsgruppe die gleiche Anzahl von Ringen aus den unterschiedlichen Spendertieren zugeteilt. Diese Verteilung hatte zudem den Vorteil, dass die Ergebnisse nicht darauf beruhen, dass z.B. eine sehr „angiogen-potente“ Maus genutzt wurde. Außerdem stammen alle miteinander verglichenen Untersuchungsgruppen aus demselben Versuchsaufbau. Zudem erschwerte die Dreidimensionalität des Ringes in der Biomatrix die Auswertung bei der Fotografie [83]. Eine gründliche Mikroskopie durch alle Ebenen war bedeutsam für eine genaue Quantifizierung. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Veröffentlichungen, die den Aortic Ring Assay zur Quantifizierung nutzten, könnten Unterschiede in der Anzahl der Aussprossungen auffallen. Zum einen können die erwähnten Einflüsse ursächlich sein, zum anderen sind diese Unterschiede mit großer Wahrscheinlichkeit damit zu erklären, dass in dieser Arbeit Fibroblasten ähnliche Strukturen nicht in die Auswertung mit einfließen (s. Abb. 6.). Der Grund für den Ausschluss aus der Quantifizierung ist, dass Fibroblasten ähnliche Strukturen keine regulären Gefäße darstellen und diese in der Literatur zusätzlich noch als hinderlich für das Blutgefäßwachstum beschrieben werden [91].

## **B. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss der extrazellulären Matrix.**

### **B.1. Aus peripheren Blutzellen gewonnene parakrine Proteine induzieren nach Freisetzung aus der extrazellulären Matrix (Collagen-Gel) stärkere Sprouting-Angiogenese als die Positiv-Kontrolle VEGF.**

Collagen-Gel-Releasate zeigte bei diesem Versuch die effektive Stimulation von Sprouting-Angiogenese. Die Anzahl an Gefäßausprossung war signifikant höher als bei der positiv-Kontrolle VEGF. Es zeigten sich bereits am dritten Beobachtungstag Gefäßausprossungen. Zu einem Zeitpunkt, wo weder in der positiv- noch in der negativ- Kontrolle Wachstum zu identifizieren waren (s. Abb. 7. und Abb. 8.). Ein signifikanter Unterschied in der Länge von Collagen-Gel-Releasate und der positiv-Kontrolle VEGF konnte nicht beobachtet werden. Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied zur negativ-Kontrolle AIM (s. Abb. 21.) festgestellt werden.

Dieses Ergebnis legt folgende Schlüsse nahe: Zuerst einmal, dass Collagen-Gel-Releasate parakrine Proteine (= Wachstumsfaktoren) enthält, die in der Lage sind, Gefäßausprossung anzuregen. Also, dass hypoxisch prä-konditionierte PBZ's geeignet sind, parakrine Proteine auf sehr physiologische Art und Weise zu produzieren. Sowohl das Sprouting-Ergebnis (s. Abb. 7.) als auch der VEGF ELISA (s. Abb. 9.), exemplarisch für den starken pro-angiogenen Faktor VEGF, verifizieren die Hypothesen, dass PBZ's unter hypoxischer Stimulation parakrine Proteine exprimieren, die Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese nehmen. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe inzwischen mittels Massenspektrometrie über 250 parakrine Proteine detektieren [92]. Diese Beobachtungen unterstützten die Idee unserer Arbeitsgruppe, das gesamte physiologische Sekretom für die Anregung von Angiogenese zu verwenden [86]. Wir denken, dass die Angiogenese besser und schneller durch die Kombination aller sezernierten Proteine stimuliert wird als durch die Verwendung von einzelnen, möglicherweise auch rekombinanten Faktoren [86].

Immerhin waren bereits zwei Tage vor der positiv- als auch der negativ-Kontrolle Gefäßaussprossungen zu sehen. Dieser Zeitvorsprung kann bei einer Therapie von entscheidender Bedeutung sein.

Für das Sprouting muss die ursprüngliche Zellwand durchbrochen werden [14]. Für diesen Durchbruch werden vor allem MMP's verantwortlich gemacht [93]. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp könnte dementsprechend eine Anwesenheit von MMP's sein. Die Anwesenheit von MMP's, in diesem Fall im Collagen-Gel-Releasate, könnte einen Anstieg an Gefäßaussprossungen erklären [94]. So entsteht die Überlegung, ob die zusätzlichen MMP's im Collagen-Gel-Releasate, im Vergleich zur positiv-Kontrolle VEGF, die vermutlich keine MMP's beinhaltet, verantwortlich für die größere Anzahl an Sproutings sind. Es wurde bereits gezeigt, dass Blutzellen MMP's bilden können [16, 86, 95]. MMP's sind Zink-abhängige Endopeptidasen [96, 97]. Die MMP Familie umfasst 24 Enzyme [97]. Wichtig zur Regulierung der Angiogenese ist eine Subgruppe der Enzyme, die als Membran-Typ MMP's (MT-MMP's) bekannt ist [97, 98]. Diese Membran gebundenen MMP's bauen auf direktem Wege interstitielles Collagen und andere Matrix-Moleküle ab [98, 99] und ermöglichen so den zytoplasmatischen Prozess des Aussprossens durch die Matrix [93]. Die MT-1 MMP biologische Aktivität ist nicht auf die Proteolyse der extrazellulären Matrix begrenzt, sondern es interagiert auch mit Integrin-Rezeptoren, welche die Endothel-Adhäsion zur extrazellulären Matrix regulieren [100, 101]. Gerade diese Eigenschaften der MMP's unterstützen die Hypothese und könnten eine Erklärung für das bessere Sprouting-Ergebnis sein. MMP's werden über verschiedene Wege kontrolliert: Transkription, Sekretion, Pro-Enzym-Aktivierung und über eine funktionelle Blockade durch tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP's) [96, 97]. TIMP's haben die Fähigkeit, die Angiogenese zu inhibieren, aber sie stellen auch sicher, dass der Abbau der extrazellulären Matrix nicht in einem Ausmaß erfolgt, dass für das Überleben der Endothelzellen wichtige Substrate verloren gehen [96, 102]. Spezifisch für das Sprouting-Assay wurden von Zhu et al. und Aplin et al. beschrieben, dass der vaskuläre Abbauprozess im Aortic Ring Assay nach knapp zehn Tagen ebenfalls mit einem Anstieg und der Akkumulation von matrix-metalloproteinasen (z.B. MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-14) assoziiert ist [103, 104]. Die Autoren berichteten zuvor ebenfalls, dass die MMP's wohl auch im

frühen Stadium eine wichtige Rolle für das Sprouting spielten [103, 104]. Des Weiteren ergab eine Studie, dass die Blockierung von MMP's die vorhandene Gefäßanzahl stabilisierte [103, 104].

Pepper et al. zeigten, dass die besten angiogenen Effekte von VEGF, unserer positiv-Kontrolle, beobachtet werden konnten, wenn VEGF in Kombination mit FGF-2 angewandt wird [105]. Es wird ein synergistischer Effekt vermutet [105]. Neben der Anwesenheit von MMP's würde dieser Synergismus wiederum für die Anwendung, des kompletten Sekretoms sprechen. Um diese Hypothesen jedoch zweifelsfrei zu klären, bedarf es weiterer spezifischer Untersuchungen.

VEGF wurde als positiv-Kontrolle gewählt, da es bereits sehr gut in diesem Versuchsaufbau untersucht wurde [5], obgleich die verwendete Matrigel-Matrix nicht ideal für VEGF induziertes Sprouting-Angiogenese geeignet ist [5]. In nicht-repräsentativen Vorversuchen zeigte sich keine Sprouting-Angiogenese bei Konzentrationen unter 90 ng/ml. Daher wurde eine Konzentration von 90 ng/ml in der positiv-Kontrolle VEGF, unter Außerachtlassung der Literatur, gewählt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine höhere Konzentration von VEGF (>30 ng/ml) weitestgehend inhibitorische Wirkung erzielte [91]. Dies könnten Argumente für das im Vergleich signifikant schlechtere Ergebnis sein. Jedoch kann dies den signifikanten Unterschied nicht vollständig erklären. Als Limitation der Studie sind sicherlich alle gewählten VEGF-Konzentrationen weit entfernt von physiologisch vorherrschenden Konzentrationen und vermutlich ebenso ursächlich für das Sprouting-Ergebnis. Vielmehr noch, wenn man die Größe des Wells in Relation zu dieser supra-/unphysiologischen Konzentration setzt. Gemeint ist damit, dass auf einer sehr kleinen Fläche sehr hohe Konzentrationen angesammelt werden, die auf den Aorten-Ring einwirken. Anders als im Gewebe, wo über Verteilung in umliegendes Gewebe und/oder Abbau der Wachstumsfaktoren eine Adaption möglich ist.

Weiterhin fällt retrospektiv auf, dass keine Kontrollgruppe ausschließlich mit Collagen-Gel getestet wurde. Rein theoretisch besteht die Möglichkeit, dass der beobachtete Effekt auf etwas, ohne es genauer eingrenzen zu können, zurückgeht, was von vornherein im Collagen Gel vorhanden ist und gar nichts mit den Blutzellen zu tun hat. Auch wenn ich diese These persönlich eher für unrealistisch halte, ist es eine Limitation der Studie.

Unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte zudem Ergebnisse, in denen die angiogene Wirkung von Collagen-Gel-Releasate in anderen Angiogenese-Assays dargestellt wurde [86]. In diesen unterschiedlichen in vitro-Assays wurden verschiedene Teilbereiche der Angiogenese untersucht. Zum einen wurde das angiogene Potential von Collagen-Gel-Releasate in einem in vitro Angiogenese Tube Formation Assay getestet. In diesem Assay wurde die Fähigkeit überprüft kleine Kapillar-Formationen zu bilden. Dazu wurden Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC's) auf faktorreduziertem Matrigel kultiviert. Das Ergebnis zeigte, dass Collagen-Gel-Releasate eine 2-fache Erhöhung von Kapillaren und eine 3-fache Erhöhung von Nodes (Zusammenschlüsse mehrerer Kapillaren) im Vergleich zum Kontroll-Medium induzierte [86]. Ebenfalls wurde von unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass die Kapillaren doppelt so lang wie die des Kontroll-Mediums waren [86].

Außerdem wurde die Fähigkeit von Collagen-Gel-Releasate in einem Endothelial-Cell-Invasion-Assay getestet [86]. Durch dieses Assay konnte die Fähigkeit kontrolliert werden, wie effektiv Endothelzellen durch eine Matrigel-Membran diffundieren konnten. Die Fähigkeit der Endothelzellen nach extravasal zu diffundieren ist relevant, um die nach extravasal, entlang des Konzentrationsgefälles gerichtete Angiogenese zu fördern. Wir beschrieben eine 2-fach erhöhte Invasion von Endothel-Zellen unter dem Stimulus des Collagen-Gel-Releasates [86].

Diese Resultate unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit und die angiogene Eigenschaft des Collagen-Gel-Releasates in verschiedenen Teilbereichen der Angiogenese und unterstreichen das Potential parakriner Proteine, die aus PBZ's gewonnen wurden.

### **B.2. Die Sprouting-Anregung durch parakrine Proteine wird zum Teil durch VEGF vermittelt.**

Collagen-Gel-Releasate präsentierte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum besser als Collagen-Gel-Releasate mit blockiertem VEGF (s. Abb. 10.). Eine erfolgreiche Blockierung von VEGF konnte mittels ELISA (s. Abb.9.) gesichert werden.

VEGF ist eines der best-charakterisierten pro-angiogenen Proteine mit über 25.000 Publikationen über dieses sehr kleine Molekül [43]. Es besitzt eine Schlüsselfunktion beim Blutgefäßwachstum und ist eines der ersten pro-angiogenen Faktoren, die entdeckt wurden [43]. Die durch VEGF stimulierte Neoangiogenese wird als porös und undurchlässig beschrieben [34]. Die Festigkeit der gebildeten Gefäßstrukturen nimmt im Verlauf der Wundheilung zu [34]. Diese Festigung wird sicherlich durch den Einfluss der vielzähligen anderen Wachstumsfaktoren vermittelt. VEGF hat multiple Isoformen und Rezeptoren [24, 43, 106]. Es sind sieben verschiedene Isoformen von VEGF bekannt, VEGF-A bis -F und PlGF (phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class), sowie drei Rezeptoren, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 [24, 43, 106]. VEGF-A, eine pro-angiogene Isoform, interagiert mit zwei Tyrosin-Rezeptor-Kinasen, VEGF Rezeptor -1 und -2. VEGF-C und VEGF-D interagiert mit Rezeptor VEGFR-3, um die Lymphogenese zu stimulieren [24]. Interessanterweise wird VEGF-1 direkt über die HIF-1 Signalkaskade reguliert [24]. VEGF-2 hingegen wird indirekt durch Hypoxie gesteigert und besitzt eine Feedback Regulierung durch VEGF Bindung [24, 107, 108]. Das hypoxische Areal im Gewebe bildet einen VEGF Signalgradienten, der in der Umgebung liegende Endothelzellen und Monozyten mittels Rezeptor-Liganden interagiert [109]. VEGF induziert Sprouting-Angiogenese durch Endothelzell-Wachstum [24]. Des Weiteren induziert VEGF Angiogenese in Form von Tube-Formation über Veränderung der Extrazellulär-Membran, indem die Intergrin-Expression und die Enzym Aktivität verändert wird [24]. Eine weitere Funktion von VEGF ist die Steigerung der vaskulären Permeabilität sowie die Vasodilatation, was bei intravenöser Gabe auch zu Hypotension führen kann [110, 111]. Aufgrund der Wichtigkeit von VEGF für die Angiogenese ist es vermehrt in den Fokus für Therapiemöglichkeiten gerückt. Die Blockierung von VEGF wird in der Onkologie und der Ophthalmologie eingesetzt [24]. In der Onkologie wird unter anderem der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) oder die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib (Sutent®, Pfizer, New York; USA) und Sorafenib (Nexavar®, Bayer, Leverkusen, Deutschland und USA) eingesetzt [24-27]. Auch in der Behandlung von Makulardegenerationen findet ein Fab-Fragment von Bevacizumab mit dem Namen Ranibizumab (Lucentis®, Genentech, South San Francisco, USA) einen Platz [24].

Zum einen sollte in diesem Versuchsaufbau untersucht werden, wie wichtig die Balance zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren ist. Zum anderen welchen Stellenwert VEGF in dieser Kaskade innehat. Das Ergebnis zeigte, dass der pro-angiogene Faktor VEGF eine wichtige Rolle spielt. Einerseits war die Anzahl der Sproutings signifikant niedriger gegenüber der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate. Andererseits war die Sprouting-Anzahl immer noch höher als die der negativ-Kontrolle AIM. Auch in der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Blockade von VEGF signifikant die Anzahl an Angiogenese reduziert [112]. Es ist aber auch bekannt, dass sich z.B. in der anti-VEGF Tumorthapie eine Resistenz entwickelt und andere angiogene Faktoren vermehrt produziert werden [113]. Für PIGF ist beschrieben, dass es nach einer anti-VEGF Therapie gesteigert produziert wird [9]. Fraglich ob sich eine solche Resistenz innerhalb eines so kurzen Zeitraums von acht Tagen (Versuchsdauer) entwickelt.

Eine andere vorstellbare Erklärung ist zu bedenken, wenn man sich überlegt, dass für VEGF bereits ein synergistischer Effekt mit FGF-2 beschrieben ist [105]. So wäre auch ein Versuchsaufbau vorstellbar, indem sowohl VEGF als auch FGF-2 blockiert werden, um herauszufinden ob FGF-2 den Unterschied gegenüber der positiv-Kontrolle verursacht oder ob noch ein anderer, vielleicht auch unbekannter Faktor, daran beteiligt ist. Nichts desto trotz bekräftigt diese Konstellation die Hypothese, dass die Angiogenese nicht nur über einen Faktor reguliert wird, sondern über ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Dieses Konstrukt ist jedoch so komplex und zu viele Variablen sind bis heute noch nicht genau verstanden [5, 16, 86]. Entsprechend wäre es aktuell noch vermessen, diese Hypothesen als eindeutig verifiziert zu betrachten. So wird z.B. in der Literatur zahlreich der Begriff der Kaskade verwendet. Ob jedoch der Begriff der Kaskade in diesem Zusammenhang richtig gewählt ist und es sich nicht tatsächlich um eine Art Domino-Effekt handelt oder um einen ganz anderen Wirkmechanismus, ist zu diskutieren. Durch die vorherrschende Unwissenheit in diesem Forschungsgebiet ist selbst eine Benennung dieses Mechanismus nicht eindeutig.

Festgehalten werden kann, dass VEGF trotzdem eine Ausnahmestellung als starker pro-angiogener Faktor in diesem Konstrukt innehat. Denn in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate-Gruppe zeigte sich ein signifikant höheres Sprouting-

Ergebnis als in der Gruppe mit blockiertem VEGF. Dies überraschte auch nicht, da die Konzentration von VEGF, nachweislich durch den ELISA bestätigt, höher lag und würde die Hypothese bestätigen. Obwohl oder vielleicht auch weil die Konzentration von VEGF in der Collagen-Gel-Releasate-Gruppe niedriger war als in der positiv-Kontrolle VEGF konnte die positiv-Kontrolle VEGF keine besseren Ergebnisse erzielen. Dies ist jedoch eher durch das Fehlen anderer Faktoren, die essentiell für den Prozess der Sprouting-Angiogenese sind, zu erklären. Die Wichtigkeit der gesamten Kaskade wurde bereits diskutiert. Nun zeigte aber die Gruppe mit blockiertem VEGF, trotz unmessbarer Konzentration von VEGF, eine höhere Anzahl an Sproutings als die negativ-Kontrolle AIM. Dies schränkt die Hypothese, dass die Sprouting-Angiogenese VEGF vermittelt abläuft, ein wenig ein. Zwar besitzt VEGF eine große angiogene Potenz Sprouting-Angiogenese anzuregen, wenn nicht sogar die größte Potenz. Jedoch auch andere Faktoren sind geeignet Sprouting-Angiogenese zu induzieren. Diese anderen Faktoren besitzen sehr wahrscheinlich jedoch nicht die gleiche Potenz wie VEGF. Das zeigt wiederum der signifikante Unterschied zur Gruppe Collagen-Gel-Releasate. Ebenfalls die Feststellung, dass die Untersuchungsgruppe mit VEGF-Blockierung am dritten Beobachtungstag annähernd blockiert erscheint zeigt, dass VEGF eine wichtige Rolle zu Beginn des Prozesses spielt. Die anderen Faktoren, die in diesem Releasate enthalten sind, können den Ausfall am dritten Beobachtungstag nicht kompensieren. Eventuell spielen diese Faktoren zu einem späteren Zeitpunkt der Angiogenese eine entscheidendere Rolle. Dieser Aspekt zeigt eine Tendenz, dass VEGF gerade am Anfang des Sprouting-Prozesses, eventuell durch den Einfluss auf Endothelzellen, benötigt wird. Enthüllt dieses Ergebnis durchaus auch, dass nicht nur die Dosierung und Anwesenheit eines einzelnen Faktors entscheidend ist, sondern auch der richtige Zeitpunkt, während der Angiogenese und die Anwesenheit von sich gegenseitig unterstützenden Faktoren (z.B. VEGF und FGF-2).

Festgehalten werden kann, dass die Sprouting-Angiogenese nur zum Teil von VEGF vermittelt wird und die Anwesenheit von anderen angiogenen Faktoren das Sprouting-Ergebnis verbessern.

### **B.3. Das Release von parakrinen Proteinen aus der extrazellulären Matrix Collagen-Gel zeigt signifikant bessere Sprouting-Angiogenese als das Release aus der extrazellulären Matrix Fibrin-Gel.**

Die durch hypoxische prä-Konditionierung entstandenen parakrinen Proteine, sollten nach Beendigung der Kultivierung in einer zellfreien Matrix gesammelt werden [32, 86]. Nach Speicherung in dieser Matrix sollte das zellfreie Release der Matrix nach Freisetzung auf seine angiogene Sprouting Fähigkeit untersucht werden. Wir vermuteten, dass die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der getesteten Matrizes Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese nehmen würden. Dieser Matrix-Carrier soll ebenfalls bei der topischen Anwendung und Injektion der parakrinen Proteine, im Rahmen einer vorstellbaren Wundauflage genutzt werden [32, 86]. So wurde vor allem eine Matrix, die durch ihre Bindungseigenschaften die Wundheilung durch einen optimierten Cocktail an angiogenen Wachstumsfaktoren unterstützt, gesucht. Im Vergleich von Collagen-Gel-Release und Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Release zeigte sich, dass Collagen-Gel-Release dem Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Release signifikant überlegen war (s. Abb.12. und Abb. 13.). Diese signifikante Überlegenheit zeigte sich nicht nur in der Anzahl der Sproutings, sondern ebenfalls in der Länge der Sproutings (s. Abb. 21.). Trotz des signifikanten Unterschiedes der beiden Matrizes konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die von PBZ's exprimierten parakrinen Proteine in der extrazellulären Matrix gespeichert und abgegeben werden.

Durch die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen im Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup> und Collagen-Gel ist eine Untersuchung auf die unterschiedliche physiologische Wirkung mit molekularem Hintergrund nur erschwert machbar. So besitzt die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Release eine Proteinmenge von 40 mg Fibrinogen und ein Volumen von 1 cm<sup>3</sup> und die Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Release eine Proteinmenge von 4 mg/ml mit einem Volumen von 3 cm<sup>3</sup> bzw. für die Proteinquantifizierung ein Volumen von 2 cm<sup>3</sup>. Jedoch war ein Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Matrix besser für eine mögliche Therapieform geeignet ist. Theoretisch könnte Collagen-Gel-Release noch mit Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Release

verglichen werden. Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate hatte eine Proteinmenge von 80 mg Fibrinogen und einem Volumen von 2 cm<sup>3</sup>. Der Vergleich machte aufgrund des noch schlechteren Sproutings von Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate (s. Abb. 19.) jedoch keinen Sinn für die Klärung der besser geeigneten Matrix. Neben der Erforschung, welche Matrix für eine denkbare Wundauflage besser geeignet ist, ist es ebenfalls relevant, da Fibrin häufig im Gesundheitswesen als Biomaterial, z.B. im Operationssaal, verwendet wird. Wir vermuteten, dass ein ungleiches Bindungsverhalten ursächlich für den gezeigten Unterschied sein könnte. In der Literatur wird bereits für Fibrin beschrieben, dass es VEGF [114], FGF-2 und andere angiogene Faktoren mit einer hohen Affinität bindet [115]. Ebenso Insulin-like-growth factor-1 und andere für die Wundheilung wichtige Peptide binden an Fibrin [116]. So sind bereits 15 Bindungen mit Fibrin bekannt [117]. Besonders zu betonen ist, dass der anti-angiogene Faktor PF-4 unter diesen 15 Bindungen zu finden ist [118]. Wir veröffentlichten unter anderem bereits, dass Collagen-Gel als Matrix sehr effektiv VEGF, als exemplarischer Angiogenesefaktor, speichern und ebenso gut wieder abgeben konnte [86]. Wir vermuteten, dass das Ergebnis damit erklärt werden kann, dass Fibrin vermehrt anti-angiogene Faktoren oder vermindert pro-angiogene Faktoren im Vergleich zu Collagen-Gel-Releasate bindet. So zeigten die ELISA-Ergebnisse (s. Abb. 14.) für Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate eine signifikant vermehrte PF-4-Bindung. Zudem wurden von unserer Arbeitsgruppe die beiden volumengleichen Untersuchungsgruppen Collagen-Gel-Releasate und Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mittels VEGF-ELISA-Quantifizierung untersucht. Die ELISA-Ergebnisse zeigten, dass Collagen-Gel-Releasate eine vergleichbare VEGF-Konzentration aufnahm [92]. Dies stärkte unsere Vermutung, dass die niedrigere PF-4-Konzentration in der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate Grund für das bessere Sprouting-Ergebnis sein müsste.

Unter der Verwendung des Collagen-Gels, ist sowohl eine topische Anwendung als auch eine injizierbare Applikation möglich [86]. Da Collagen eine Hauptkomponente in der Wundmatrix ist [39], lässt sich mutmaßen, dass es die Wundheilung zumindest nicht behindert, wenn es als Matrix exogen zugeführt wird. So sollte das Einbringen von Collagen-Gel, während der Reifung von Granulationsgewebe, die lokale Angiogenese der Wundumgebung nicht negativ beeinflussen.

Es ist festzuhalten, dass beide extrazelluläre Matrices die exprimierten parakrinen Proteine speichern und abgeben können. Zudem konnte gezeigt werden, dass Collagen-Gel sich wohl besser als Matrix eignet und die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Matrix diesen Unterschied verursachen.

#### **B.4. Eine erhöhte Konzentration von PF-4 hat einen anti-angiogenen Einfluss auf die Sprouting-Angiogenese.**

*(Textteile bereits zur Veröffentlichung eingereicht [32])*

Collagen-Gel-Releasate war über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant besser als die Untersuchungsgruppe Serum (s. Abb. 15. und Abb. 16.). In diesem Vergleich sollte die bereits bekannte, anti-angiogene Wirkung von PF-4 bestätigt werden. Folgende Zahlen aus der Literatur belegen die hohe Konzentration von PF-4 im Serum durch Proteinquantifizierung: 1. Konzentration von PF-4 in Serum: 8965 ng/ml; 2. Platelet-poor EDTA Plasma (n=36): 78,8 ng/ml; 3. Platelet-poor Heparin Plasma (n= 36): 292 ng/ml. (Quelle: Quantikine ELISA; Human CXCL 4/ PF4 Immunoassay; R&D Systems; Catalog Number DPF40; 2013) [119]. Ebenso wie eine hohe VEGF-Konzentration die Angiogenese inhibieren kann, so ist auch eine höhere Konzentration von Serum (1% v/v) in der Literatur als hinderlich beschrieben [91]. Höhere Serumkonzentrationen begünstigen die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen, welche nicht förderlich für die Bildung neuer Blutgefäße sind [91]. Aber viel wahrscheinlicher wird dieses Ergebnis dadurch hervorgerufen, dass über die Gerinnungskaskade vermittelte Aktivierung der Thrombozyten die Ausschüttung von PF-4 aus der Granula gesteigert ist. PF-4 ist bekannt als ein anti-angiogener Faktor [87]. Durch die im Vergleich zu Plasma höhere Konzentration von PF-4 im Serum könnte die schlechtere Aussprossung erklärt werden. Die für die Herstellung der Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate durchgeführten Blutentnahmen erfolgte in EDTA-Vacutainer. Durch die so erreichte Antikoagulation und die damit verbundene Hemmung der Gerinnung, handelt es sich um Plasma. Nachdem die vorhergehenden Ergebnisse zeigten, dass Collagen-Gel-Releasate weniger PF-4 bindet als Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate sollte wiederholt gezeigt werden, dass eine PF-

4-reiche Untersuchungsgruppe keine gute Sprouting-Angiogenese ermöglicht. Die Aktivierung durch die Einleitung der Gerinnung von Thrombozyten im Serum, ist vermutlich verantwortlich für die in der Proteinquantifizierung gefundenen hohen PF-4-Konzentrationen. Betrachtet man die Literatur, findet sich ein Verfahren, das ebenfalls über die Aktivierung von Thrombozyten seine Wirkung erzielen soll.

Das Ziel des sogenannten Platelet Rich Plasma (PRP)-Verfahrens ist das Erreichen einer erhöhten Konzentration von Wachstumsfaktoren durch eine Konzentrationssteigerung der Thrombozyten. Diese supra-/ unphysiologische Konzentration an Wachstumsfaktoren wird erreicht, indem die Thrombozyten, aktiviert durch die Gerinnungskaskade, Wachstumsfaktoren ausschütten. Plättchenreiches Plasma (PRP) ist ein definierter Anteil der Plasma-Fraktion von autologem Blut mit einer Thrombozyten-Konzentration oberhalb des Grenzwertes (300 000-350 000 platelets/ul) [120-122]. Es beinhaltet autologe Proteine, deren Funktion in der Stimulierung von dermalen Fibroblasten und Endothelialzellen nach Injektion besteht [123-125]. Eine Thrombozyten-Aktivierung in einer Wunde führt zur Entwicklung von Pseudopodien, zur Aggregation und letztendlich zur Plättchen-Degranulation [126]. Die Degranulation der Thrombozyten gibt Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF-beta1 (transforming growth factor beta-1), TGF-alpha (transforming growth factor alpha), PF-4 (platelet factor-4), PAF (platelet activating factor), Thrombospondin, Platelet Thromboplastin, Koagulationsfaktoren, Serotonin, Histamine, hydrolytische Enzyme und Endostatin, frei [126-129]. Typischerweise ist die Konzentration der Thrombozyten im PRP etwa 5-10-fach so hoch wie die normale Thrombozyten-Konzentration im Blut [130] und besitzt damit eine etwa 80-100-fach erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren [131]. Vorstellbar ist somit sogar, dass es durch diese zwei Mechanismen der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenkonzentrierung zu noch höheren PF-4-Konzentrationen als im Serum kommt. Der erhöhte PF-4-Spiegel könnte ein Grund sein, wieso unter Verwendung des Verfahrens PRP keine eindeutig guten Ergebnisse bei chronischer Wundbehandlung erzielt werden konnten [119, 131-138]. Um unmissverständlich die beiden Verfahren miteinander vergleichen zu können, benötigt es weitere Untersuchungen, idealerweise

mit einer Untersuchungsgruppe, die nach einem Protokoll für PRP-Herstellung gefertigt wurde, wie sie auch bei der Behandlung von Patienten zur Anwendung kommt. In der Literatur sind verschiedene Methoden von konventionellen zu kommerziellen Verfahren für die PRP Herstellung beschrieben. Unterschiede dieser Methoden basieren in der Aktivierung durch Zugabe von z.B.: Collagen, Calcium und/ oder Thrombin, durch Glas-Kontakt, Gefrierkreise und der Anwendung als Suspension oder Gel [139-141]. Bekannt sind verschiedene Kits zur Herstellung von PRP, z.B. das ACP® Verfahren (Arthrex, Deutschland) oder andere wie My cells® (My Cells), Selphyl® (UBS Aesthetics. USA), Regent Lab® (Regent Labs, USA) [142], Cascade® (MTF Cascade, USA), Arterioocyte Magellan® (Magellan PRP, USA), GPS II® (Biomet, Schweiz) [136]. Allerdings gibt es eine Streuung in der Zusammensetzung von PRP, die auf die verschiedensten Protokolle zurückzuführen ist [136]. So ist selbst unter den drei kommerziellen Verfahren die Streuung bei fünf gesunden Probanden so hoch gewesen, dass unterschiedliche Konzentration der Wachstumsfaktoren und Leukozyten bei den drei untersuchten kommerziellen Verfahren gefunden wurde [136, 141]. Die unterschiedlichen Herstellungsverfahren machen es schwierig die PRP-Zusammensetzung zu standardisieren und die Wirkungsweise zu untersuchen. Das macht es ebenso schwer eine einheitliche Wirkweise zu gewährleisten. Logischerweise beeinflussen unterschiedliche Protokoll Variationen das Endergebnis und sind als Ursache für die o.g. Streuung denkbar. Solche Variationen sind z.B. die Größe des Blutabnahme-Vacutainers, die Dauer und die Rotationsgeschwindigkeit bei der Zentrifugation und/ oder das Antikoagulans [136]. Bezüglich der Zentrifugation ist ein Vorteil für Verfahren beschrieben, die zwei Zentrifugationen nutzen [137]. Das einmalige Zentrifugieren zeigt niedrigere Thrombozyten-Konzentrationen [137]. Die Zentrifugation ist notwendig für die Konzentrierung der Thrombozyten. Des Weiteren führt eine höhere Rotationsgeschwindigkeit zu einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten [135]. Höhere Konzentrationen führen jedoch nicht zwangsläufig zu besseren klinischen Ergebnissen [120, 135, 143].

Bereits in den frühen 1960er Jahren wurde von Schulte et al. die Möglichkeit beschrieben, Wunddefekte mit autologem Eigenblut zu behandeln. Dazu wurde zunächst autologes Blut und einige Jahre später zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung von Zysten verwendet [144, 145]. Allerdings fanden diese Arbeiten international wenig

Beachtung. Die erste Nutzung von PRP ist für das Jahr 1987 durch Ferrari et al. beschrieben [146, 147]. Genutzt hatte die Arbeitsgruppe PRP bei einer offenen Herzoperation, um exzessive homologe Bluttransfusionen zu vermeiden [146, 147]. Erst ab etwa 1996 wurden autologe Blutprodukte wieder zur Blutstillung bzw. als Gewebekleber verwendet [121, 148]. So kam es 1997 zur Veröffentlichung eines Verfahrens zur Herstellung von PRP [149]. Im Jahr 1998 wurde die erste klinische Studie zur Anwendung von PRP an Patienten in der Kieferchirurgie veröffentlicht [150]. Anwendung findet PRP heute vor allem in der Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie, der Orthopädie, in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, bei der Behandlung diabetischer Wunden und in der plastischen Chirurgie [123]. Zurzeit ist PRP für kosmetische Anwendung in den USA populär. Diese klinischen und kosmetischen Behandlungen finden ihre Anwendung, da PRP Einfluss auf verschiedene Zellarten, wie Fibroblasten, Endothelialzellen, Stamm- und Fettzellen hat. Unter anderem erhöht PRP die Expression von Kollagen-Typ-I und der matrix-metalloproteinase-1 in Fibroblasten und fördert so die Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten [135, 136, 151]. Myofibroblasten führen über den Mechanismus der Kontraktion die Wundränder zusammen [36, 39, 53]. Brill et al. beschrieb, dass Thrombozyten eine dosisabhängige Gefäßausprossung im Ratten Aorten Ring Model induzierten [152]. Dieses Ergebnis zeigte, dass Thrombozyten einen stimulierenden Effekt auf Endothelialzellen besitzen [152]. Aus meiner Sicht macht die Untersuchung von PRP im Aortic Ring Assay nur Sinn, wenn zuvor die Thrombozyten durch Zugabe von z.B. Thrombin und/ oder Calciumchlorid aktiviert werden. Zum einen, da die Aktivierung der Thrombozyten durch die körpereigene Gerinnung bei Verwendung außerhalb einer in vivo-Situation ausbliebe bzw. der Effekt nicht durch das Assay erfasst werden würde. Zum anderen da eine zellfreie Untersuchungsgruppe notwendig ist, um die Aorten-Ringe in der Mikroskopie darstellen zu können. Eben diese nötige Aktivierung macht die Quantifizierung von PRP in diesem Modell und die Beurteilung der Ergebnisse schwierig. Zugleich hat PRP Einfluss auf Stammzellen. Kakudo et al. beobachtete einen Anstieg der Anzahl von adipösen Stammzellen (ADSC) und verstärkte dermale Fibroblasten Proliferation in Anwesenheit von 5% PRP [131, 153, 154]. Jedoch auch eine rückläufige Wachstumsrate bei höheren Konzentrationen [131, 153, 154]. Einige Autoren demonstrierten, dass eine Nutzung von PRP in Kombination mit Fettzellen ein

erhöhtes Fettzellen-Überleben bewirkte [123]. PRP stimuliert eine angiogene Kaskade und Fibroblasten-Aktivität, die zu einem erhöhten Überleben und zu einer dreidimensionalen Organisation der Fettzellen führt [155, 156]. So bietet PRP eine optimale Mikroumgebung, die zu einer besseren Zell-zu-Zell-Interaktion, einem adipösen Gewebe-Wachstum und der Protektion von inflammatorischen Events führte [123]. Schlussendlich induzierte PRP ein frühes neoangiogenes Kapillar-Netzwerk, das mit einer erhöhten Versorgung von Nährstoffen und Sauerstoff der transplantierten Fettzellen einherging [123, 157, 158]. Nichtsdestotrotz sind die genauen Vorgänge und Einflüsse von PRP auf die Wundheilung oder andere Anwendungen bis heute, trotz knapp 20-jähriger Bekanntheit, nicht richtig verstanden [136]. Was jedoch beschrieben ist, ist ein antibakterieller Effekt [135, 159]. Dieser Effekt wurde auf die Serotonin-Ausschüttung aus der Alpha-Granula der Thrombozyten zurückgeführt und/ oder auf die Aktivität von rekrutierten Leukozyten [135, 160-162]. Ebenfalls in diesem Zusammenhang beschrieben ist die Reduktion für ein neuropathisches Schmerzsyndrom [163]. Bei der Behandlung von chronischen Wunden wird ein limitierter und nicht eindeutiger Erfolg beschrieben [119, 131, 132, 135-138]. Multicenter randomisierte Studien, die mit einer großen Anzahl von Patienten einhergehen, wurden bisher nicht durchgeführt [133, 135].

Die Untersuchungsgruppe Serum zeigte ein schwächeres angiogenes Potential im Vergleich zu Collagen-Gel-Releasate. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Inkubation unter Hypoxie vor allem durch die Herunterregulierung von anti-angiogenen Faktoren, wie TSP-1 und PF-4, zu einer Optimierung der angiogenen Wirkung von Collagen-Gel-Releasate führen kann [86]. Das signifikant bessere Ergebnis von Collagen-Gel-Releasate unterstützt diese Vorgehensweise. Die Ergebnisse sind im Einklang mit der Überlegung der Arbeitsgruppe und bieten eine sinnvolle Erklärung. Die Downregulierung/ Reduktion der anti-angiogenen Faktoren durch die Regulierung mittels Hypoxie ist eine entscheidende Veränderung im Vergleich zu PRP. Mit einer Downregulierung ist aber keineswegs das völlige Fehlen der anti-angiogenen Faktoren gemeint. Auch die Verwendung einer physiologischen Konzentration, gewonnen durch hypoxische Regulierung, im Gegensatz zu einer supra-/ unphysiologischen PRP-Konzentration sowie die zellfreie Anwendung sind Gegensätze zu PRP. In der Literatur veröffentlichte Proteinquantifizierungsergebnisse unterstreichen diese Theorie, indem

in fünf Tage hypoxisch prä-konditioniertem Plasma (HPP) eine 30% niedrigere Konzentration an PF-4 im Vergleich zur Blutserumkonzentration gemessen wurde [119].

Aber auch der Unterschied der zellfreien Applikation ist nicht zu vernachlässigen. Wenn PRP injiziert wird, bedeutet das, dass zusätzliche lebende Zellen mit aktivem Stoffwechsel an die Stelle einer Ischämie gebracht werden. Die applizierten Thrombozyten produzieren zwar die angesprochenen Faktoren, gleichzeitig verbrauchen sie aber Sauerstoff. Dieser ist für die ortständigen Zellen sowieso schon unzureichend, da im Rahmen des Wunddefektes die Blutzufuhr und somit der Sauerstofftransport unterbrochen ist. Aus diesem Grund kann es sein, dass die angespannte Sauerstoff-Versorgung noch weiter leidet.

Am Rande erwähnt ist es, aus biologischer Sichtweise gesehen, sinnvoll Vollblut zu verwenden. Da zusätzlich zu der Thrombozyten- und Granulozyten-Fraktion auch die peripheren mononuklearen Blutzellen starke angiogene Wachstumsfaktor-Produzenten sind [86, 164-168].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigten die Hypothese, dass PF-4 in hohen Konzentrationen anti-angiogen wirksam ist und sie zeigen Unterschiede eines möglichen Therapieansatzes, gemessen an einem etablierten Verfahren (PRP). Zusammengefasst sind die Hauptunterschiede dadurch gekennzeichnet, welcher Zelltyp zur Faktor-Produktion genutzt wird, wie die Art der Zellaktivierung geschieht und auf welchem Weg die Faktoren bereitgestellt werden. Es soll deutlich werden, dass die Effektivität der verschiedenen Blutprodukte von ihrer Zusammensetzung, welche durch ihre Herstellungsverfahren definiert ist, abhängt.

### **B.5. Die biophysikalische Regulation durch die extrazelluläre Matrix auf die Zusammensetzung der parakrinen Proteine und dessen Auswirkung auf die Sprouting-Angiogenese.**

Bei der Untersuchung der Matrices im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Änderung der Masse von Fibrin Auswirkungen auf das Sprouting-Ergebnis nimmt. Wie bereits im ersten Teil berichtet, ist Fibrin dafür bekannt, dass es

mit einer Anzahl von Wachstumsfaktoren Bindungen eingeht. Demzufolge sollte eine größere Masse an Fibrin-Gel vermehrt Bindungen eingehen. Jedoch blieb zum damaligen Zeitpunkt die Frage offen, ob der pro- oder anti-angiogene Effekt nach der Bindung überwiegt. Um dies auf den Grund zu gehen wurden zwei unterschiedliche Massen ( $1 \text{ cm}^3$  und  $2 \text{ cm}^3$ ) von Fibrin-Gel getestet.

In einem ersten Schritt wurde jedoch zuerst mit Cultured-Clot-Releasate, also einer natürlichen Form der Fibrin-Matrix gezeigt, dass es die Sprouting-Angiogenese signifikant unterstützt (s. Abb. 17. und Abb. 18.). Obwohl die Untersuchungsgruppe unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurde, wurden die Zellen hypoxisch präkonditioniert. Diese Hypoxie entsteht durch den Sauerstoffverbrauch der in der Untersuchungsgruppe enthaltenen Zellen [119]. Daher war die korrekte Abdichtung durch dreischichtiges Parafilm essentiell. Cultured-Clot-Releasate zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant mehr Sprouting-Angiogenese als die negativ-Kontrolle AIM und die positiv-Kontrolle VEGF. Unsere Arbeitsgruppe zeigte aber auch, dass die Untersuchungsgruppe Cultured-Clot-Releasate, getestet im in vitro tube formation Assay, eine signifikant kleinere Anzahl an Tubes und Nodes als die positiv-Kontrolle VEGF erzeugte [92]. Unserer Arbeitsgruppe fiel während des Vergleiches der beiden Assays eine unterschiedliche Morphologie der Strukturen auf [92]. Die Morphologie des Cultured-Clot-Releasate zeigte vermehrt Zellverklumpungen, während die positiv-Kontrolle ein feines, differenziertes Netz an Gefäßstrukturen zeigte [92]. Diese Beobachtung in den verschiedenen Modellen ließ uns erwarten, dass unterschiedliche biochemische Regulationen der Tubulogenese beeinflusst werden [92]. Weiter erwarteten wir, dass Cultured-Clot-Releasate angiogene Faktoren beinhaltet, die für die Sprouting-Angiogenese notwendig sind aber zugleich anti-angiogen wirksam auf die Vorgänge der Tube Formation sind. Im Verdacht stand der angiogene Faktor PF-4.

PF-4 ist ein anti-angiogener Wachstumsfaktor, der durch Megakaryozyten synthetisiert und in der alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert wird [169, 170]. Bikfalvi berichtete, dass durch PF-4 das Endothel-Zellwachstum und die Endothel-Migration, sowie die Angiogenese in vitro und in vivo inhibiert wurden [171]. Drei Mechanismen sind für diese inhibitorische Wirkung bekannt: Erstens bindet PF-4 Proteoglykane und unterbindet damit den Proteoglykane-Bystander-Effekt auf die Wachstumsfaktor-

Aktivität [171]. Zweitens bindet PF-4 direkt einige Wachstumsfaktoren wie FGF und VEGF [171]. Drittens kann PF-4 Zelloberflächenrezeptoren von Endothelzellen aktivieren, die dann inhibitorische Signale aussenden [171]. Andererseits präsentierten neuere Erkenntnisse, beschrieben von Jamison et al., dass zumindest die Dissoziation von Endothelzellen durch PF-4 angetrieben wird [172]. Mit Dissoziation ist gemeint, dass die Endothelzellen sich von benachbarten Zellen lösen, um in das entstehende Wundgebiet zu migrieren [172]. Nebenbei ist für PF-4 ebenfalls eine pro-atherogene Rolle beschrieben [173].

Auf dieser Basis wurden Experimente mit verschiedenen Fibrin-Volumina durchgeführt. Im Sprouting-Angiogenese-Assay zeigte Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate ein deutlich besseres Ergebnis, als Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate über den gesamten Beobachtungszeitraum (s. Abb. 19. und Abb. 20.). Allerdings waren die Unterschiede der Mittelwerte statistisch nicht signifikant. Dennoch vermuten wir, dass dieser Unterschied kein Zufall gewesen ist. Gestärkt wird diese Vermutung durch Untersuchungen der verschiedenen Fibrin-Massen in einem anderen Angiogenese-Assay, durchgeführt durch unsere Arbeitsgruppe. Durch das Angiogenese-Assay, welches weniger komplex ist, konnte die inverse Korrelation der Fibrin-Masse mit der Anzahl der Sproutings signifikant bestätigt werden [92]. Dass die Fibrin-Untersuchungsgruppe mit der größeren Masse im Mittelwert ein schlechteres Sprouting-Ergebnis aufzeigte, implizierte, dass die Konzentration von anti-angiogenen Faktoren, z.B. PF-4 in der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate größer sein müsste, oder aber, dass eine geringere Menge angiogener Faktoren für diesen Effekt verantwortlich ist.

Der Proteinquantifizierung (s. Abb. 23.) zeigte eine signifikant höhere PF-4-Konzentration für Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate. Die Bindung von PF-4 in der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate war etwa doppelt so hoch, wie die der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup> Releasate. Daher wurde angenommen, dass Fibrin den anti-angiogenen Wachstumsfaktors PF-4 bindet und somit durch vermehrte Bindung das schlechtere Sprouting-Ergebnis der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate erklärt werden kann. Ob Fibrin nicht auch andere anti-angiogene Faktoren bindet, die in diesem Zusammenhang exprimiert werden, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen mit Blockierungen

anderer bekannter anti-angiogener Faktoren wie z.B. TSP-1 könnten aufschlussreich sein. Vorerst ungelöst blieb folglich die Frage, wieso die Untersuchungsgruppe ohne PF-4 (Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate) nicht bessere Ergebnisse zeigte. Durch die erfolgreiche Blockierung, die mittels Proteinquantifizierung bestätigt werden konnte (s. Abb. 24.), bot sich die Möglichkeit, die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate mit PF-4-Blockierung, die in unserem Versuch weniger Gefäßaussprossung zeigte als die ohnehin schlechtere Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate, miteinander zu vergleichen (s. Abb. 20. und Abb. 21.). In der Literatur ist unter anderem der Effekt von Thrombozyten auf die Angiogenese im Aortic Ring Modell beschrieben [152]. Dort wurde geschildert, dass durch die Blockierung von PF-4, der im Thrombozyten-Releasate vorhanden ist, die Rate der Aussprossungen gesteigert werden konnte [152]. Es kann vermutet werden, dass durch die Blockierung von anderen anti-angiogenen Faktoren wie Thrombostatin-I oder Angiostatin ein ähnliches Ergebnis erzeugt werden kann. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen. Das Sprouting-Ergebnis zeigte nun aber etwas Anderes. Nämlich, dass das völlige Fehlen von PF-4 die Anzahl an Sproutings nicht steigerte. Die Diskrepanz zu den in der Literatur gefundenen Ergebnissen könnte dadurch zu erklären sein, dass Autoren Fibroblasten ähnliche Strukturen mit in die Auswertung nahmen, während in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Die Begründung hierfür ist die Ansicht, dass Fibroblasten ähnliche Strukturen keine regulären Gefäßstrukturen darstellen und sie dem Wachstum von Blutgefäßen eher hinderlich sind [91]. Abgesehen davon, dass in dieser Untersuchungsgruppe keine Fibroblasten ähnliche Strukturen zu sehen waren. Allerdings ist durch das Zusammenspiel aller Faktoren, der angiogenen Kaskade die Untersuchung eines einzelnen Effekts zugegebenermaßen auch erschwert. Es ist nicht möglich einen Effekt frei von anderen Einflüssen zu beobachten. Was trotz der Schwierigkeiten für die Auswertung dieses einzelnen Phänomens ein Argument für die aufgestellte Hypothese ist, dass die angiogene Kaskade ihre Wirkung durch eine große Vielfalt an komplexen Wechselwirkungen mehrerer, einzelner Faktoren erzeugt. In einem Modell mit weniger Wechselwirkungen, wie z.B. dem Angiogenese-Assay, ist von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, dass die Abwesenheit von PF-4 eine signifikant zweifache Erhöhung von Tubes bewirkte, die jedoch jederzeit kleiner als die positiv-Kontrolle VEGF blieb [92]. Zu betonen ist jedoch, dass dieses Angiogenese

Assay einen anderen Teilbereich (tube formation) der Angiogenese untersucht. Denn bei der Sprouting-Angiogenese stellte sich der Sachverhalt ein wenig anders dar. So ist fernab aller Erwartungen das Ergebnis ohne bzw. mit reduzierter Konzentration des anti-angiogenen Faktors PF-4 nicht besser. Schon der Vergleich dieser Ergebnisse aus den unterschiedlichen Assays, mit dem Augenmerk auf unterschiedliche Teilbereiche der Angiogenese, könnten ein weiteres Indiz dafür sein, dass PF-4 speziell für die Form des Sproutings wichtig sein könnte. Zwar ist in der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate mit geringer Konzentration an PF-4, verglichen mit Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate, die Anzahl der Sproutings gesteigert (s. Abb. 19.), jedoch auf Kosten der Größe der Strukturen (s. Abb. 21.). Das Ergebnis der Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate zeigte keinen Unterschied zur Kondition ohne PF-4 (Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup> + Anti-PF-4-Releasate). Weiterhin ist zu beobachten, dass die Untersuchungsgruppe mit der höchsten Konzentration von PF-4 (Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate) zwar nach wie vor eine kleinere Anzahl an Sproutings besaß, jedoch die Sproutings auch signifikant länger waren als in der Untersuchungsgruppe, die frei von PF-4 war. So wirkt PF-4 zwar nach wie vor anti-angiogen aber nimmt wohl eine wichtige Funktion in der Dissoziation von Endothelzellen [172] ein und stellt damit wohl einen wichtigen Bestandteil für die Phase der Initiation des Sproutings dar. Denn damit Endothelzellen von ihrer ursprünglichen Position abwandern können, müssen sie zunächst den Kontakt zu benachbarten Zellen in der Gefäßwand lösen. Endothelzellen sind dann alleine fähig, weitere Gefäßbildung zu initiieren [174]. Eine weitere mögliche Erklärung könnte auch die bekannte Bindung von PF-4 an VEGF sein [171]. Immerhin ist VEGF ein starker Antrieb für das Endothelzell-Wachstum [24].

Erinnern wir uns an die offen gebliebene Frage, wieso die Untersuchungsgruppe ohne PF-4 nicht besser als die Untersuchungsgruppe Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate, hinsichtlich der Sprouting-Anzahl abschnitt. So ist diese Frage, nach Berücksichtigung der Quantifizierungsergebnisse nun vermutlich so zu beantworten: Es ist zu spekulieren, dass die Konzentration von PF-4 zu niedrig war, um die Dissoziation von Endothelzellen anzuregen. Sicherlich war die Balance der PF-4 freien Untersuchungsgruppe, stellt man sich das Konstrukt wie eine Waage vor, weiter auf der pro-angiogenen Seite als bei der besser abschneidenden Untersuchungsgruppe

Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate. Jedoch konnte dieser Vorteil nicht wirksam werden, da durch die fehlende Dissoziation von Endothelzellen die „Kaskade“ des Sproutings an einer Stelle eingeschränkt war. In diesem Zusammenhang sollte überlegt werden, ob unter Berücksichtigung dieser neuen Daten, die Einordnung in die Kategorie „anti“-angiogen nicht unzutreffend verwendet wird. Erst ab einer gewissen Konzentration trifft die Einordnung wohl wieder wörtlich zu. Diese Ergebnisse bestärken die Vorgehensweise des Therapieansatzes, die die anti-angiogenen Faktoren durch Inkubation unter Hypoxie herunter regulieren [86] und nicht, wie in anderen Methoden, vollständig blockieren oder aber nur isolierte pro-angiogene Faktoren nutzen. Es ist schwer vorstellbar, dass die richtige Konzentration aller Faktoren quantifiziert und, im Sinne eines angiogenen Cocktails, kopiert werden kann. Erschwerend kommt sicherlich auch die individuelle Kapazität von Wachstumsfaktor-Produktion hinzu. Um die optimale Konzentration eines Faktors zu erreichen, ist bisher die Hypoxie als die oberste Regulierung der vielversprechendste Ansatz [16]. Oben drein folgt dieser Ansatz einer rein natürlichen Regulierung.

Schon Paracelsus sagte im Jahre 1538 in einem anderen Zusammenhang: „Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht´s, dass ein Ding kein Gift sei.“ Ebenso verhält es sich mit der Angiogenese: die unterschiedlichen Konzentrationen und Konzentrationsunterschiede („die Dosis“) der Faktoren spielen eine große Rolle. Dies verdeutlicht den Effekt des schon angesprochenen Gleichgewichtes von pro- und anti-angiogenen Faktoren. Eine zu hohe PF-4-Konzentration hemmt das Sprouting. Unter anderem durch die Bindung von PF-4 an VEGF [171]. Aber eine zu niedrige PF-4-Konzentration gewissermaßen ebenfalls, da vermutlich die Dissoziation der Endothelzellen fehlt. Das deutet darauf hin, dass die Abhängigkeit des Sproutings von der PF-4-Aktivität wahrscheinlich nicht linear abläuft, sondern eine absolute Hemmwirkung bei sehr niedrigen und hohen Konzentrationen ausgeübt wird [92]. Um dies mit letzter Gewissheit sagen zu können müsste ein PF-4-Konzentrationsgradient erstellt werden, der zeigt, dass PF-4 einer Wirkkurve folgt und bei sehr hohen und sehr niedrigen Werten anti-angiogen wirksam ist. Da es hierzu keine Daten gibt, muss diese Frage aktuell, trotz beschriebener Tendenz, ungelöst bleiben.

Werden diese Ergebnisse in die physiologische Wundheilung übertragen, so könnten sie einen Teil dazu beigetragen haben, eine bisher nicht beschriebene Regulierung, während der Wundheilung, aufzuzeigen. Die Veränderung der Fibrin-Masse hat, über die Bindung von exemplarisch PF-4, Auswirkung auf die Endothelial-Zellen und damit auf die Sprouting-Anzahl und -Länge [92]. Im Sprouting-Assay zeigte Fibrin-Gel 1 cm<sup>3</sup>-Releasate eine Tendenz, mehr Sprouting zu induzieren als Fibrin-Gel 2 cm<sup>3</sup>-Releasate, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (s. Abb. 19.). Durch Proteinquantifizierung (s. Abb. 23.) konnte eine Bindung von PF-4 an Fibrin gefunden werden, die das Sprouting-Ergebnis sinnvoll erklärt. Weiter konnte gezeigt werden, dass PF-4 ebenfalls Einfluss auf die Länge von Sproutings hat. Martino et al. spekulierten bereits, dass die große Anzahl an Bindungen von Fibrin mit Wachstumsfaktoren nicht zwecklos sind, sondern physiologische Gründe dahinter stehen, die Einfluss auf die Wundheilung nehmen [117].

Unmittelbar nach einer Verletzung ist eine effektive Koagulation notwendig, um einen großen Blutverlust zu verhindern. Die unverzügliche Einleitung der Angiogenese wäre in dieser Phase kontraproduktiv, da die neu gebildeten Gefäße zerbrechlich und instabil wären [92, 175]. Daher beginnt die Angiogenese während der Wundheilung nicht vor dem dritten bis vierten Tag [92, 176, 177]. Die zentrale Rolle des Fibringerüsts stellt anfänglich eine strukturelle Stütze für Thrombozyten dar, um eine stabile Blutstillung zu gewährleisten [92]. Gleichzeitig dient das Fibringerüst aber auch als Matrix für Zellen und gebildete Wachstumsfaktoren [92]. Wir berichteten, dass Fibrin neben seiner Rolle als Strukturgeber für anhaftende Zellen eine Matrix für die direkte Kommunikation mit dem umgebenden Gewebe zur Verfügung steht [92]. Bereits die „Growth-factor-trap-Hypothese“ vermutete, dass Makromoleküle, wie Fibrinogen und Fibrin, Wachstumsfaktoren aufnehmen, sie gefangen halten, so dass sie für die Wundheilung nicht mehr zur Verfügung stehen [60]. Über diese Kommunikation kann Fibrin entsprechend der Größe der Wunde massenabhängige Bindungen mit Faktoren eingehen [92]. Pro-angiogene Faktoren können lokal im entsprechenden Fibringerüst gespeichert werden bis das Fibringerüst einen stabilen Zustand erreicht, ohne die Hämostase zu stören [92]. In einer Reihe von in vitro-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im Freisetzungverhalten der Schlüssel pro- und anti-angiogenen Faktoren, VEGF und

PF-4, abhängig vom Volumen der Fibrinmatrix ist [92]. Der Zusammenhang zwischen dem Fibrinvolumen und der Anzahl und der Länge der Sproutings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden und unterstütze die Arbeit der Arbeitsgruppe. Ein Grund für die massenabhängige Bindung könnte sein, dass Änderungen im Volumen die Proteinfaktor-Retention/ -Freisetzungskinetik durch Veränderung der Porengröße und der Verfügbarkeit von Faktor Bindungsstellen beeinflusst [92, 178]. Die inhibitorischen Effekte des Fibringerüsts werden durch Initiierung der Fibrinolyse, und damit einhergehend einer Reduktion der Fibrinmasse und Reduktion des lokalen Pools von anti-angiogenen Faktoren rückgängig gemacht [92]. Während der Fibrinolyse werden angiogene Fibrinfragmente (z.B. FNE) freigesetzt, die synergistisch mit anderen pro-angiogenen Faktoren wie VEGF, bFGF wirken [92, 179]. Präzise ausgedrückt koordiniert Fibrin dadurch die Balance zwischen Hämostase und der Phase der Proliferation/ Angiogenese. Zusammengefasst zeigte unsere Arbeitsgruppe unter Verwendung dieser Daten, dass das Fibringerüst initial eine anti-angiogene Barriere schafft, um die Hämostase zu unterstützen, um dann nach der Hämostase die Angiogenese durch fibrinolytisch vermittelte Disinhibition zu unterstützen [92].

Die Hypothese, dass die extrazelluläre Matrix Fibrin über Massenänderung biophysikalisch die Wundheilung beeinflusst, indem die Matrix die Zusammensetzung der parakrinen Faktoren reguliert, kann somit angenommen werden. Wie vermutet, reguliert die extrazelluläre Matrix Fibrin mit höchster Wahrscheinlichkeit die physiologische Wundheilung, genauer gesagt die Balance zwischen Hämostase und Angiogenese, über Massenänderung. In dieser Arbeit wurde die massenabhängige Bindung zu PF-4 diskutiert, die sicherlich auch einen Anteil an dieser Regulierung besitzt. Aber nicht PF-4 alleine ist für diesen Effekt verantwortlich. So wurde bereits die VEGF-Bindung an Fibrin erwähnt [92]. Ebenfalls denkbar ist, dass andere Faktoren eine Rolle spielen. Denn nicht nur dieses Ergebnis lehrte bereits, dass die angiogene Kaskade ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren ist. Natürlich kann eingewendet werden, dass die verwendeten Konzentrationen nicht physiologisch seien und deshalb schwer auf die natürliche Wundheilung übertragen werden könne. Allerdings wird eine Korrelation der Effekte deutlich, die sicherlich auch bei der Verwendung von physiologischen Konzentrationen eintreten würde. Ob unter Verwendung dieser physiologischen Konzentrationen allerdings die zur Verfügung

stehenden Assays sensitiv genug wären diese Unterschiede zu detektieren, ist allerdings fraglich. Abgesehen davon arbeiten alle durchgeführten Studien mit unphysiologischen Konzentrationen. Aber diese Tatsache stellt nicht ernsthaft in Frage, dass dieses komplexe Zusammenspiel an diesem Schnittpunkt der Wundheilung, sehr wahrscheinlich durch die Massenänderung bedingte Zusammensetzung der parakrinen Proteine der extrazellulären Matrix Fibrin reguliert wird.

Diese Ergebnisse sind ebenfalls von klinischer Bedeutung und erklären die Notwendigkeit und Hintergründe eines chirurgischen Débridement. Durch das Abtragen von Fibrinbelägen wird die Wundheilung zeitlich in geringerem Maße herausgezögert, indem der anfängliche inhibitorische Effekt des Fibringerüsts auf die Phase der Proliferation/ Angiogenese reduziert wird. Dieser inhibitorische Effekt wird durch die angesprochene massenabhängige Bindung von Wachstumsfaktoren mit Fibrin erzeugt. Die durch das chirurgische Débridement reduzierte Masse an Fibrin ermöglicht einen schnelleren Phasenwechsel und begünstigt so die Wundheilung und die Einheilung von rekonstruktiven Verfahren (wie z.B. Spalthaut, lokale Lappen mit axialer Durchblutung, regionale Lappen und/ oder freie Lappen) in das Wundbett. Bei pathologischen Wunden kann durch das chirurgische Débridement die krankhaft entstandene Anatomie entfernt werden und bietet so die Möglichkeit einer Initiierung der physiologischen Wundheilung.

### **C. Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf mögliche Therapieansätze zur verbesserten Behandlung chronischer Wunden.**

*(Textteile bereits zur Veröffentlichung eingereicht [32])*

#### **C.1. Aktuelle Wundbehandlungsstrategien**

Im Sinne des Leitsatzes der Technischen Universität München „Wissenschaft-Heilung (Quelle: Offizielle Homepage des Klinikums) ist das Verständnis des Wundheilungsprozesses, sowie der angiogenen Wachstumsfaktoren, die die

physiologische Wundheilung regulieren und/ oder stören, eine Grundvoraussetzung, um suffiziente Therapiemöglichkeiten zu entwickeln [63, 64]. Bei der chronischen Wunde ist der physiologische Wundheilungsverlauf unterbrochen bzw. verzögert und muss wiederhergestellt werden [59, 180]. Um den physiologischen Wundheilungsverlauf wieder herzustellen sollte zuerst die Kausaltherapie (z.B. Revaskularisierung) optimiert werden [59, 65]. Ziel der lokalen Wundbehandlung ist es, die chronische Wunde möglichst schnell, bei einem belastungsstabilen Nabenergebnis, zum Abheilen zu bringen [59]. Weitere Komplikationen sollten vermieden werden [59]. Falls die Wunde nicht zur Abheilung gebracht werden kann, ist zumindest die Schaffung von Wundverhältnissen, die einen operativen Wundverschluss ermöglichen, das Ziel [59, 181].

Die Lokalthherapie der chronischen Wunde folgt, abgesehen von Ausnahmefällen (wie z.B. malignen Tumoren) und der Therapie der Wundursache, den fortlaufenden Prinzipien: 1. Wundreinigung; 2. Granulations- und 3. Epithelisierungsförderung [57, 59]. Dies geschieht im Prinzip in mehreren Schritten, die in Abhängigkeit von den Wundverhältnissen unterschiedlich intensiv durchgeführt werden müssen [59, 181-183].

Nach Wundreinigung, also die Schaffung eines Wundgrundes, der frei von avitalem Gewebe, Nekrosen, Fremdkörpern, Belägen bzw. Detritus ist, sollte bei der Wundbehandlung ein physiologisch feuchtes Milieu in der Wunde geschaffen und aufrechterhalten werden (= chirurgisches Débridement) [59]. Schon die alten Römer kannten das Prinzip der feuchten Wundaufgabe [34]. Wurden damals angebrochene Kohlblätter um die Wunde gewickelt, so stehen heute moderne Materialien zur Verfügung [34]. Das feuchte Wundmilieu fördert die Proliferation der am Heilungsprozess beteiligten Zellen und begünstigt deren Wanderung [34]. So können Granulation und Epithelisierung wesentlich schneller ablaufen [34]. 1962 zeigte Winter erstmals experimentell am Schwein, dass es unter einem Okklusivverband früher zu einer vollständigen Epithelisierung kommt als bei Luftexposition [34, 63]. Dies konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden [34].

Von der feuchten Wundaufgabe sollte, laut Leitlinie (S3-Leitlinie 091-001 „Lokalthherapie chronischer Wunden bei den Risiken CVI, pAVK und Diabetes mellitus“, Stand 2012), nur abgewichen werden, wenn das klinische Bild einer avitalen trockenen Nekrose

besteht [59]. Nekrosen sollen nicht rehydriert werden [59]. Im klinischen Alltag wird diese Leitlinienempfehlung meist durch unterschiedlichste Wundauflagen oder durch die Vakuumtherapie umgesetzt.

Das Spektrum der verfügbaren Wundversorgungsprodukte hat sich von den klassischen Verbandmaterialien zu einem beinahe unüberschaubaren, sich ständig vergrößernden Angebot an Wundauflagen und Lokalthérapeutika erweitert [59].

Der klassische Verband, mit dem die Wunde nur abgedeckt wird, ist mittlerweile um Wundauflagen und verschiedene topische Externa erweitert, die ein sich kontinuierlich erweiterndes Sortiment darstellen [59]. Die Einteilung der Wundauflagen kann nur bedingt anhand der verwendeten Materialien (sog. Produktgruppen) erfolgen [59]. Wichtige Produktgruppen sind z.B.: Kompressen (Baumwolle/ Kunstfaser), Gaze (aus unterschiedlichen Materialien), Folien, Alginate, Hydrogele, Hydrokolloide, Schaumstoffe, Mikrofasern/ Hydrofasern, Polyacrylate (superabsorbierend) [59].

Die Wundauflage sollte der individuellen Wundsituation, der Gewebeart, der Exsudatmenge, der Größe und Lokalisation der Wunde sowie den Bedürfnissen des Patienten angepasst sein [59]. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, sind auch die physikalischen Eigenschaften der Wundauflagen, wie Haftstärke, Elastizität, Entfernbarekeit ohne Schmerz und Ruckstände, von hoher Bedeutung [59, 184]. Grundsätzlich sollen alle Materialien, die mit der Wunde in Berührung kommen, steril sein [59, 185]. Die Wundauflage/ der Verband sollte die Wunde feucht halten, vor einer Verunreinigung und/ oder weiteren Besiedelung mit Krankheitserregern und traumatischen Einflüssen schützen, bei Entfernung keine Ruckstände hinterlassen und das Gewebe nicht mechanisch beschädigen [59, 184]. Die neu gebildeten Kapillaren in einem frühen Wundheilungsstadium sind wenig widerstandsfähig und benötigen Schutz vor mechanischer Traumatisierung [52]. Weiterhin sollte Exsudat aufgenommen und eine für die Wundheilung optimale Feuchtigkeitsbalance aufrechterhalten werden, ohne dass es zur Austrocknung der Wundfläche oder zu Mazeration kommt [59]. Dabei sollten Toxine, Bakterien und Gerüche ebenso wie Wundexsudat in der Wundauflage aufgenommen und nicht wieder abgegeben werden [59]. Des Weiteren sollte die Atmungsaktivität/ Sauerstoffversorgung nicht beeinträchtigt werden und die Wundauflage in der Anwendung praktikabel sein [59].

Eine häufig verwendete Behandlungsform stellt die Vakuumtherapie dar [59]. Bei der Vakuumtherapie erfolgt die Anbringung eines porösen Schwamms auf bzw. in eine Wunde [59]. Die Wunde wird anschließend unter Einschluss des Schwamms meist unter Verwendung einer Folie luftdicht abgeschlossen [59]. Danach erfolgt die Anlage eines Unterdrucks in den Schwamm, der sich aufgrund der luftdichten Situation zusammenzieht [59]. Hierdurch entstehen ein lokaler Unterdruck im Gewebe und ein stetiger Exsudatabtransport [59]. In Abhängigkeit der verschiedenen Sogapplikationsformen entstehen verschiedene lokale Drücke bzw. Anwendungsmöglichkeiten (kontinuierlicher Sog, intermittierender Sog, Spül-Saug-Wechsel) [59]. Der dauerhaft oder intermittierend angelegte Sog führt zu einem Abtransport von den an der Wundoberfläche liegenden Stoffen (Exsudatmanagement) [59]. Der Sog führt, da die Wundfläche mittels Folie luftdicht abgeschlossen wird, zudem zu einem lokalen Druck auf das Gewebe [59]. Hieraus resultieren eine lokale Ödemreduktion und Durchblutungsveränderungen im Wundareal aber auch in der Umgebung [59]. Diese führen zu vielfältigen, bis heute nur zum Teil verstandenen Veränderungen in der Physiologie der Wundheilung [59]. Eventuell führt die Reduktion des Ödems zur Verkleinerung der Diffusionstrecke für wundheilungsfördernde Stoffe. Ob die Abläufe der physiologischen Wundheilung durch die Vakuumtherapie beschleunigt werden, ist nicht bewiesen [54, 186, 187]. Da die Vakuumtherapie bei Wunden unterschiedlichster Ätiologie, Chronizität, Größe und Lokalisation eingesetzt wird, unterscheiden sich die Studien erheblich in der Auswahl und Definition der Endpunkte [188]. Allein aus diesem Grund ist die Sinnhaftigkeit einer quantitativen Zusammenfassung aller Studien fragwürdig [188]. Untersuchungen mit Ergebnissen zur Wundheilung berichten mehrheitlich über Vorteile der Vakuumtherapie [188]. Die vorliegenden Studienergebnisse reichen immer noch nicht für eine eindeutige Klärung der Frage, ob die Vakuumtherapie der konventionellen Wundbehandlung überlegen ist, aus [188]. So stellt die Vakuumtherapie sicherlich eine elegante Lösung für das Management chronischer Wunden dar, jedoch kann dieser Therapieansatz die Wundheilung nach heutigem Kenntnisstand auch nur unterstützen und nicht induzieren.

## C.2. Angiogenese als Therapieansatz

Trotz des großen Sortiments an Wundaufgaben sind keine Wundaufgaben verfügbar, die in allen Phasen der Wundheilung gleich wirksam sind und alleine zum Erfolg führen [189].

Wie oben beschrieben, organisieren Fibroblasten während der Wundheilung die Reparatur des geschädigten Gewebes. Endothelzellen entwickeln neue Blutgefäße, die in das heranwachsende Gewebe hineinsprossen. Leukozyten verhindern eine Infektion. All diese Mechanismen beruhen auf der autokrinen und parakrinen Regulation durch Hypoxie, die über multiple Zytokine und Wachstumsfaktoren, als oberste Steuerungszentrale fungiert [190]. Betrachtet man zusätzlich die Pathologie der Wundheilungsstörung ist verständlich, weshalb einige vielversprechende Therapieansätze für chronische Wundheilungsstörungen auf Grundlage des Verständnisses der angiogenen Regulierung umgesetzt werden soll. Erschwert werden diese Therapieformen dadurch, dass die angiogene Kaskade bis heute nicht komplett entschlüsselt ist [5, 86]. Ziel dieser Therapieansätze ist es, den chronischen Wunden das verloren gegangene angiogene Signaling zurückzugeben [16]. Vor allem die Hypoxie, als Reiz für die Einleitung der angiogenen Kaskade, tritt immer mehr in den Fokus des Interesses [16]. Innerhalb der letzten zehn Jahre entwickelte sich ebenfalls ein wachsendes Interesse an Therapien, welche auf der Nutzung von autologem Blut zur Behandlung basieren. Viele Methoden der Vergangenheit, die darauf abzielten, chronische Wunden zu therapieren, waren darauf ausgerichtet, einen isolierten rekombinanten angiogenen Wachstumsfaktor zu applizieren [16]. Die Ernüchterung bei Ergebnissen dieser Methode führte zu einem Umdenken [126]. Es entwickelte sich die Einsicht, dass es nicht ausreicht, ein komplexes Konstrukt, welches die Angiogenese-Kaskade darstellt, durch das Zugeben eines einzelnen Bausteins anzukurbeln. Moderne Methoden tendieren dazu, die komplette physiologische Angiogenese, getriggert durch den physiologischen Stimulus Hypoxie, zu nutzen [16]. Die Nutzung von Hypoxie als Stimulus wird in verschiedenen Therapieansätzen verfolgt (siehe B. 3.a.bis einschließlich B. 3.e.). Zum Beispiel gibt es Strategien, die Zellen oder Gewebe vor der Transplantation mit Hypoxie

vorbehandeln. Andere Herangehensweisen nutzen Hypoxie, um das Signalling durch pharmakologische Lösungen zu induzieren oder durch Gentransfer zu steigern [16, 191-197].

### **C.2.a. Angiogenese durch zellfreie pharmakologische Therapie**

Durch die Exposition der Zellen mit Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) oder Deferoxamin (DFO) kann der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel, die HIF-1-DNA-Bindungs-Aktivität und die HIF-1-transkriptionale Aktivität erhöht werden [16, 192, 193]. Diese Wirkung wird erzielt durch die Hemmung der PHD's [16, 192, 193]. Der so stabilisierte Transkriptionsfaktor induziert über direkte und indirekte Signalkaskaden eine Ausschüttung von angiogenen Faktoren [47]. In der Tat bewies eine Studie, dass die intraperitoneale Verabreichung von DFO in einer älteren Maus zu einer Wiederherstellung der HIF-1-alpha-Expression und zur ischämieinduzierten Mobilisation von endothelial progenitor cells in einem ischämischen Hautlappen führte [16, 198]. Die Ergebnisse zeigten eine vergleichbare Vaskularisierung und eine Überlebensrate des ischämischen Hautlappens wie bei einer jungen Maus [16, 198].

### **C.2.b. Angiogenese basierend auf prä-Konditionierung von Zellen**

Im Jahre 2008 zeigte Kubo et al., dass hypoxische prä-Konditionierung eine erhöhte Überlebensrate und angiogene Potenz mononuklearer Blutzellen (PBMNC's) bewirken [16, 194]. Drei Tage nach einer intramuskulären Implantation in ischämische Hintergliedmaßen von Mäusen war das Überleben von hypoxie-vorkonditionierten PBMNC's höher als das der unter Normoxie kultivierten PBMNC's. 28 Tage nach der Behandlung waren die Microvessel-Dichte und der Blutfluss in den ischämischen Hintergliedmaßen der Mäuse signifikant besser, welche zuvor hypoxie-vorkonditionierte PBMNC's implantiert bekommen hatten [16, 194].

Eine im Jahr 2012 durchgeführte Studie zeigte, dass die Transplantation von hypoxie-vorkonditioniertem Knochenmark mesenchymale Stammzellen anregte, Angiogenese

und Neurogenese zu stimulieren [16, 195]. Die Studie zeigte, dass die hypoxische prä-Konditionierung von transplantierten Zellen bei zerebralen Ischämien von Ratten eine Steigerung der Regenerationsfähigkeit bewirkte [16, 195].

### **C.2.c. Angiogenese durch zellfreie Gen-Therapie**

Vincent et al. konstruierten im Jahre 2000 ein Hybridprotein, bestehend aus der DNA-bindenden Dimerisierungsdomäne der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit und der Transaktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus-VP16-Proteins, um einen starken Transkriptionsaktivator zu erstellen [16, 191]. Nach Transfektion aktivierte dieser chimäre Transkriptionsfaktor die Expression des endogenen VEGF-Gens, sowie mehrerer anderer HIF-1-Zielgene in vitro [16, 191]. Die in vivo-Verabreichung des HIF-1 $\alpha$  Hybridgens in einem Kaninchenmodell mit Ischämie der Hintergliedmaßen war assoziiert mit signifikanten Verbesserungen des Blutdruck-Verhältnisses, des angiographischen Scores, der regionalen Durchblutung und der Kapillardichte [16, 191].

### **C.2.d. Angiogenese basierend auf Gen-Therapie**

Neben dem Einbringen von Genen direkt ins Gewebe durch Verwendung von Virus- oder Peptid-basierenden Vektoren wurde eine andere Strategie erforscht [16, 197]. Diese Strategie basierte auf genetischer Modifizierung ausgewählter Zellen in vitro, vor einer Transplantation [16, 197]. In der Tat förderten retroviral transduzierte Stromazellen des Knochenmarks (BMSC's) über stabile Formen von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  die Differenzierung von BMSC's zu endothelialen Zellen und induzierten die Hochregulation von angiogenen Proteinen, welche die tube formation verbesserten [16, 197].

### **C.2.e. Angiogenese basierend auf zellfreier prä-Konditionierung**

Di Santo et al. berichteten erstmals 2009 über eine zellfreie Therapie, die konditionierte Medien von hypoxisch vorbehandelten Zellkulturen bereitstellte [16, 196]. Sie konnten zeigen, dass die Medien Angiogenese in vitro und in vivo induzierten [16, 196]. Das konditionierte Medium von endothelialen Vorläuferzellen (EPC-CM), hemmte nach 72 Stunden hypoxischer Kultivierung die Apoptose von reifen Endothelzellen [16, 196]. Zudem förderte es die Angiogenese im Ratten Aortic Ring Assay [16, 196].

### **C.3. Therapieansatz: Angiogenese basierend auf hypoxisch prä-konditionierten Blutzellen (EmaCure)**

Eine Weiterentwicklung des Systems von Di Santo et al. wurde zuerst von Hadjipanayi & Schilling unter dem Schirm des Projektes EmaCure beschrieben [119]. Sie erkannten ebenfalls, dass Hypoxie ein nützliches Mittel zur Verstärkung des angiogenen Potentials ist. Durch die hypoxische extrakorporale Inkubation (Wundsimulation) konnte eine wundartige Mikroumgebung geschaffen werden, worauf Zellen mit der Produktion einer natürlichen Konzentration von Wachstumsfaktoren reagierten [119]. Diese Reaktion soll physiologisch die Konzentration von Wachstumsfaktoren erhöhen. Die natürlich erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren sollten im Anschluss mittels Matrix-Carrier (Collagen-Gel, Fibrin-Gel) einer Therapie zugänglich gemacht werden [16, 119]. In diesem Therapieansatz mit eingeschlossen ist der Arbeitsschritt der Filtrierung, sodass ein zellfreies Produkt entstehen sollte.

Die Herangehensweise die Hypoxie zu nutzen ist sinnvoll, da Hypoxie eine Schlüsselrolle der angiogenen Stimulierung einnimmt [16, 17]. Zellen einer hypoxischen Umgebung auszusetzen, um angiogene Faktoren zu produzieren, ist bereits gut erforscht [199-201]. Die ersten Konzepte der Wissenschaftler beruhten auf der Verwendung von Fibroblasten, die als produzierende Zellen genutzt wurden, um implantierbare und injizierbare Systeme für die von den Fibroblasten produzierten Faktoren zu entwickeln [200], z.B. für Hautfibroblasten, die in einer hoch konzentrierten

3D-Collagenmatrix kultiviert wurden, was durch die hypoxische Kultivierung zu einer Hochregulation von VEGF-Expression innerhalb des Matrix-Kerns führte [200]. Die Abgabe solcher Hypoxie-induzierten Faktoren in vivo hat sich als wirksam bei der Förderung der Vaskularisierung, Oxygenierung und Host-Integration subkutan platzierter Collagenimplantate gezeigt [199, 202]. Als Weiterentwicklung der Arbeit mit Fibroblasten als produzierende Zellen, wurden nun periphere Blutzellen (PBZ's) getestet. PBZ's sind die idealeren Kandidaten zur Faktorenbereitstellung, da es einen reichlichen Vorrat gibt, sie leichter zu erlangen sind und sie immunologisch ungefährlich sind, da sie vom eigenen Individuum stammen [86, 119]. Die Studienlage zeigte im Vorfeld, dass PBZ's unter Stress (z.B.: Hypoxie, Ischämie, Entzündung, Ultraschall, usw.) mit einem Anstieg von angiogenen Wachstumsfaktoren reagierten [86]. Es wurden Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor) [86, 95, 203-206], PDGF (platelet-derived growth factor) [86, 207], bFGF (beta Fibroblast growth factor) [86, 95, 204], IL-8 (interleukin-8) [95], MMP-9 (matrix-metalloproteinasen-9) produziert [86, 95]. Weitere Studien zeigten, dass PBZ's die Fähigkeit besitzen, in vitro Angiogenese anzuregen [86, 208, 209]. Zum Beispiel ist für die Sekretion von peripheren mononukleären Blutzellen (PMZ's) beschrieben, dass sie die Wundheilung in Mäusen verbessern konnten [86, 210]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte dazu beitragen, einen möglichen Therapieansatz in seiner Entwicklung weiter voranzutreiben. Dadurch, dass gezeigt werden konnte, dass Hypoxie ein nützliches Mittel zur Verstärkung des angiogenen Potentials von peripheren Blutzellen (PBZ's) ist und diese, unter Verwendung der gesamten angiogenen Kaskade, effektiv Sprouting-Angiogenese induzierten (s. Abb. 7. und Abb. 8.), konnte Abstand von der Verwendung von Fibroblasten genommen werden. Seither wurde der Therapieansatz stetig weiterentwickelt und weiter erforscht. Unter anderem konnte der in dieser Arbeit sehr aufwändige Herstellungsprozess der Wachstumsfaktoren vereinfacht werden. Die Fortschritte in der Entwicklung des Therapieansatzes bieten die Möglichkeit, die aufgestellte Zielsetzung zu diskutieren. Dazu wird in folgenden Textabschnitten wissenswertes und Entwicklungsschritte des Therapieansatzes zusammengefasst. Durch die hypoxische extrakorporale Wundsimulation konnte eine wundartige Mikroumgebung geschaffen werden, worauf PBZ's mit der Produktion einer natürlichen Konzentration von Wachstumsfaktoren

(parakrinen Proteinen) reagierten [119]. Diese Reaktion der PBZ's erhöhte physiologisch die Konzentration von Wachstumsfaktoren und entspricht dem in Abb. 4. schematisch dargestellten Herstellungsprozess. Der Therapieansatz enthält Wachstumsfaktoren in natürlich vorkommenden Konzentrationen und Verhältnissen, die auch physiologisch in einer Wunde produziert werden. Da die PBZ's nach der Entnahme vorbehandelt werden, enthält das Endprodukt zur Behandlung höhere Konzentrationen von Wachstumsfaktoren als zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die erhöhte Konzentration entsteht durch die Induktion einer neuen Produktion von Wachstumsfaktoren, die durch Hypoxie stimuliert und reguliert wird. Die Verwendung dieses Verfahrens unterschätzt nicht die Signifikanz der gerinnungsvermittelten Wachstumsfaktorkaskade für die Induktion einer physiologischen Regeneration. Stattdessen erkennt es an, dass die Ausschüttung von Thrombozyten produzierten Faktoren automatisch innerhalb einer traumatischen oder iatrogenen Wunde (z.B. nach einer Injektion) stattfindet. Nach der Entnahme wird das Blut unter sauerstoffarmen (hypoxischen) Bedingungen und bei physiologischer Körpertemperatur (37 Grad Celsius) vorbehandelt (prä-konditioniert) und so zur Produktion von Wachstumsfaktoren angeregt [119]. Durch Kultivierung des Blutes unter ähnlichen Bedingungen, wie sie in der Wundmikroumgebung vorzufinden sind (physiologische Temperatur und Hypoxie), werden Blutzellen (PBZ's) dazu stimuliert, parakrine Proteine, welche die Wundheilung unterstützen, hochzuregulieren. Daher ist das Releasate reich an Faktoren (z.B. VEGF), die endotheliale Zellmigration und Gefäßneubildung (Angiogenese) fördern [16, 86]. Die angesprochene Kultivierung wird typischerweise über einen Zeitraum von zwei bis sieben Tagen durchgeführt [119]. Eine Kultivierung unter physiologischen Temperaturen (37 Grad Celsius) zeigte in anderen Studien eine stetig höhere VEGF-Konzentration, als unter Raumtemperatur und somit ein höheres angiogenes Potential [119]. Die physiologische Temperatur ist notwendig, um die zelluläre Protein-Aktivität beizubehalten. Hypoxische prä-Konditionierung kann zum einem durch Kultivierung in einem Oxygen kontrollierten Inkubator erfolgen oder indem die Zellen in einer natürlichen hypoxischen Mikroumgebung kultiviert werden, welche durch den eigenen Sauerstoffverbrauch der Zellen entsteht [119]. Die Erkenntnis auf einen Oxygen kontrollierten Inkubator verzichten zu können, macht den Herstellungsprozess deutlich einfacher und

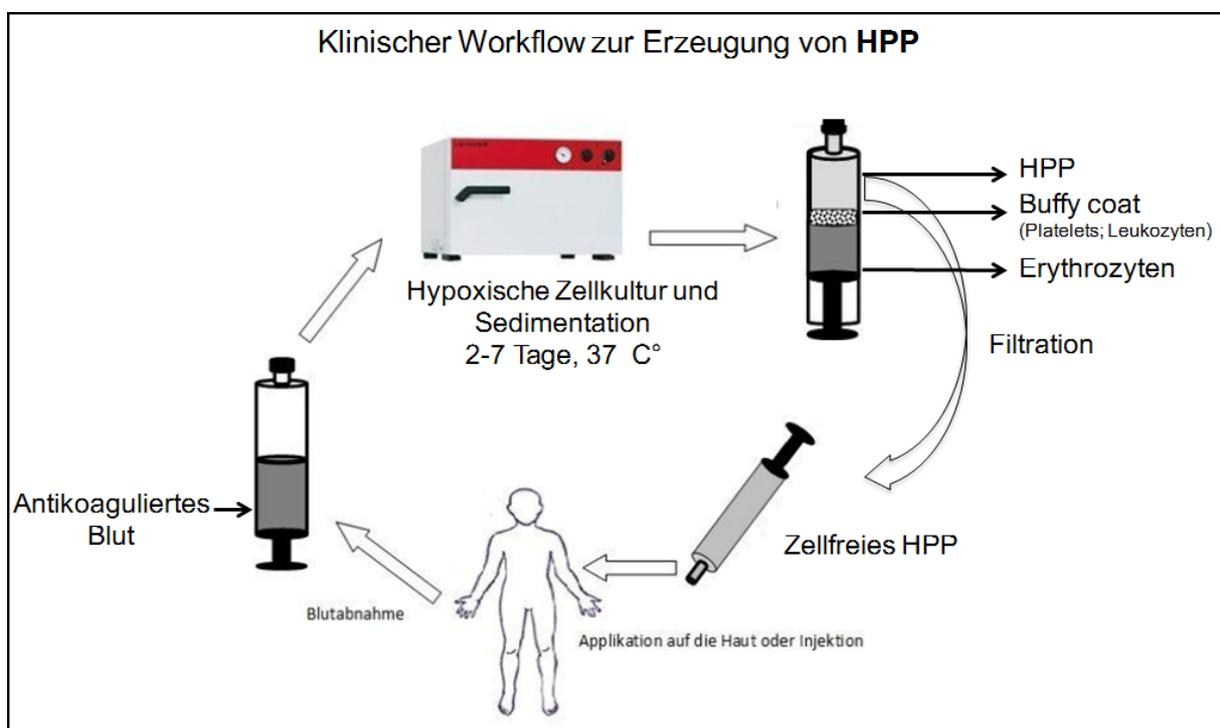
kostengünstiger für mögliche Anwender [16]. Da Blutzellen im Laufe der Kultivierung sedimentieren, kann z.B. wachstumsfaktorhaltiges Plasma oder Serum, je nach Einstellung der Gerinnung, passiv von den anderen Blutzellen getrennt werden, ohne es zu zentrifugieren. Allerdings unterliegt die Expression bestimmten Faktoren (z.B. VEGF, TSP-1) wie die zeitlichen Änderungen in Reaktion auf die Hypoxie, welche sich nicht linear darstellen [86]. Dieser Effekt entsteht durch Gewöhnung der zellulären Reaktion auf die hypoxische Stress-Stimulation [86]. Des Weiteren wies unsere Arbeitsgruppe nach, dass die anti-angiogenen Faktoren, wie z.B. TSP-1 initial zwar hochreguliert wurden, jedoch nach prolongierter hypoxischer Inkubation der PBZ's sich eine Downregulierung anschloss [86]. Auch andere Autoren beschreiben den hemmenden Effekt von Hypoxie auf das anti-angiogene Signalling [17, 86, 119, 211, 212]. Darüber hinaus wird in der Konditionierungsphase der hier verwendeten Methode durch eine Hemmung der Blutgerinnung mittels Antikoagulantien (z.B. EDTA), ebenfalls die Ausschüttung von Gegenspielern, wie z.B. PF-4 und TSP-1 gehemmt. Diese werden vermutlich durch die Gerinnungsreaktion bedingte Aktivierung der Thrombozyten freigelassen. Diese Hemmung führt zum Übergewicht regenerativer und gefäßneubildender Faktoren. Zusätzlich kommt die hypoxische Downregulierung anti-angiogener Faktoren hinzu. Wahrscheinlich ist die Hemmung der Blutgerinnung jedoch nicht entscheidend, da über die Hypoxie die Wachstumsfaktor-Zusammensetzung angepasst wird. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auf Antikoagulation verzichtet werden kann. Theoretisch wird durch die fehlende Antikoagulation ein größeres Angebot an Wachstumsfaktoren gestellt, die durch die Hypoxie bedarfsgerecht modelliert werden können. Somit enthält das Releasate eine optimierte bedarfsangepasste Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren, die der vom eigenen Körper produzierten Zusammensetzung während der Wundheilung ähnlich ist [119]. Eine hypoxische Stress-Stimulation der PBZ's geht jedoch auch mit einem signifikanten Anstieg von toten Zellen einher [119, 200]. Als Reaktion auf diese toten Zellen könnte der Körper theoretisch mit einer inflammatorischen Reaktion reagieren [119]. Das hat zur Folge, dass eine sichere Nutzung von hypoxisch induzierten Sekretomen ein zellfreies Matrix-System notwendig macht. Das Therapieverfahren und der hier bereits angewendete Herstellungsprozess bietet durch eine Filtrierung solch ein zellfreies Matrix-Carrier-

System zur kontrollierten Abgabe der angiogenen Wachstumsfaktoren an und gewährleistet auf diesem Weg ein zellfreies Medium. Durch dieses zellfreie Medium steht den ortsständigen Zellen einer Ischämie der gesamte Sauerstoff zur Verfügung, da anders als bei PRP, keine Zellen appliziert werden, die stoffwechselaktiv sind. Es wird ein Medium injiziert, welches nicht in den Stoffwechsel eingreift und zugleich die Angiogenese fördert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und viel mehr die Forschungsanstrengungen der gesamten Arbeitsgruppe führten zur Entwicklung eines One-Step-Bioreaktors, der dazu genutzt werden kann, autologes peripheres Blut zu sammeln, zu filtern und zu kultivieren [86]. Es vereint den gesamten Herstellungs-Prozess in einem Bioreaktor und soll die klinische Anwendung erleichtern. Mittlerweile konnte ein erster Prototyp entwickelt werden. Damit können parakrine Proteine, welche im zellfreien Plasma vorhanden sind, innerhalb eines Matrix-Carriers („Matrix delivery vehicle“) gesammelt werden. Für diese Sammlung wird Collagen-Gel als Matrix-Carrier verwendet. Dass Collagen-Gel als Carrier geeignet ist, zeigte unter anderem die Datenlage dieser Arbeit. Collagen-Gel bietet die Möglichkeit der topischen Anwendung und der Injektion [86]. Wie in dieser Arbeit diskutiert wurde, sind keine negativen Auswirkungen auf die Wundheilung durch das Einbringen des Collagen-Gels zu erwarten.

Mit Hilfe des Therapieansatzes soll vor allem chronischen Wunden, die die Fähigkeit verloren haben Wachstumsfaktoren zu produzieren [16], deren eigene Wachstumsfaktoren wieder zugeführt werden. Dadurch dass die Wachstumsfaktoren aus autologem peripherem Blut gewonnen werden und das Releasate zellfrei ist, beruht der Therapieansatz auf einem sehr physiologischen Ansatz und somit mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen einher [16]. Die beabsichtigten Verwendungsgebiete sind vorwiegend schwer heilende Wunden, Ulcera und Verbrennungen, also überall dort, wo ein Defizit der Blutzufuhr zur Wunde vorhanden ist [119]. Durch die geeignete Zusammensetzung dieses Releasates und aufgrund der leichten und gefahrenlosen Anwendung sind weitere Indikationen denkbar. Um die Vielfältigkeit dieser Methodik zu präsentieren folgt ein kurzer Ausblick für mögliche klinische Anwendungsgebiete. Für die Nutzung im klinischen Alltag wurde ein Workflow entwickelt, der die Produktion von parakrinen Proteinen, im Vergleich zu der aufwändigen Herstellung im Labor, erleichtern soll. Durch diese Translation aus dem

Labor in die Klinik soll die Therapiemöglichkeit, sowohl für den Anwender als auch den Patienten leichter zugänglich gemacht werden. In der Praxis werden bei Hypoxie prä-konditionierten Produkten (Abkürzung: HypPP) ebenfalls aus patienteneigenem Blut Wachstumsfaktoren gewonnen. Die Wachstumsfaktoren werden je nach Einstellung der Gerinnung an das Plasma (Hypoxisch prä-konditioniertes Plasma: HPP) oder Serum (Hypoxisch prä-konditioniertes Serum HPS) abgegeben. Der Herstellungsprozess (s. Abb. 25.), hier von HPP, unterscheidet sich in wenigen Punkten von bereits bekannten Herstellungsverfahren im Labor.



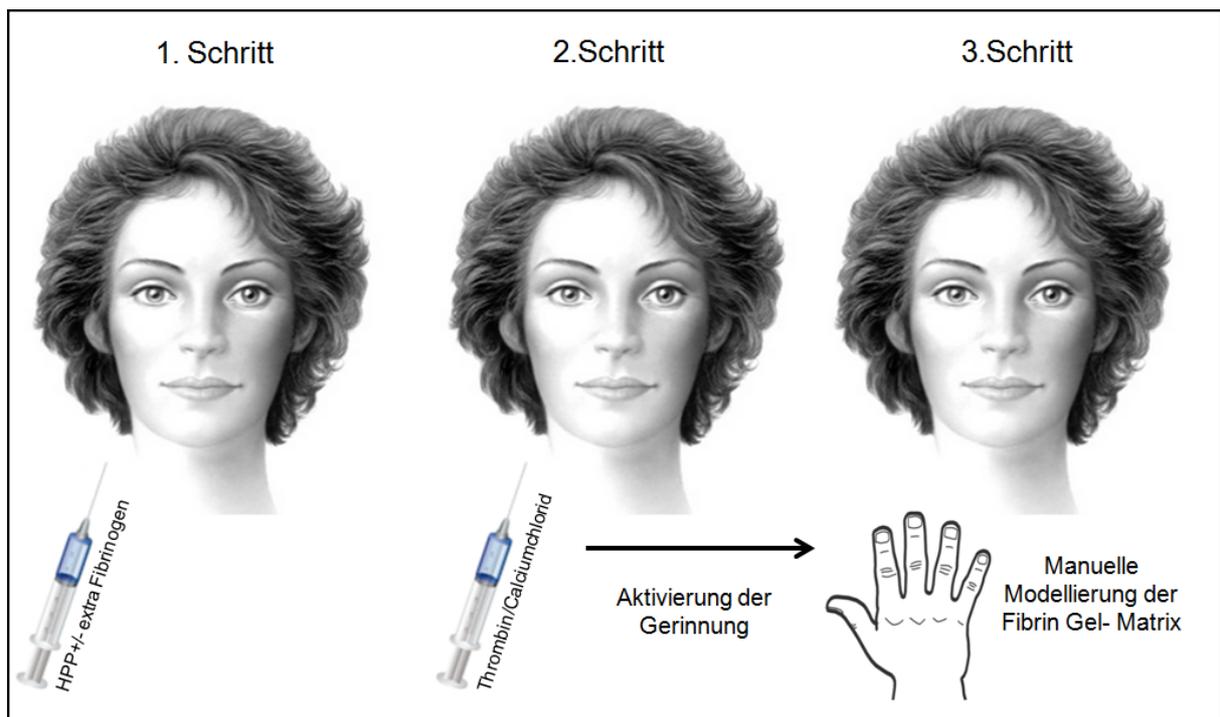
**Abb. 25.:** Herstellungsprozess HPP

Nach angesprochener Blutabnahme, folgt eine hypoxische Inkubation für zwei bis sieben Tage. Durch physiologische Sedimentation entsteht die bekannte Dreischichtung. Das hypoxisch inkubierte Plasma, welches nach Inkubation reich an parakrinen Proteinen ist, stellt die oberste Schicht dar. Diese wird im Anschluss filtriert. Nach Filtration ist das zellfreie Präparat bereit für die Anwendung am Patienten.

Nach Herstellung des Präparats kann die Substanz bei -20° Celsius gelagert werden und ist für mindestens drei Monate (nach Blutentnahme) haltbar, ohne dass die

Wachstumsfaktoren ihre Bioaktivität verlieren [213]. Vermutlich ist für den Erhalt der Bioaktivität das Protein Albumin verantwortlich, das eine Proteinstabilisierung im Plasma bewirkt [119]. Die Möglichkeit der Lagerung ist ein Vorteil zu PRP, wo sicherlich aufgrund der Notwendigkeit von intakten Thrombozyten eine Lagerung nicht möglich ist. Wahrscheinlich werden die Zellen durch eine Lagerung unter  $-20^{\circ}$  Celsius beschädigt. Dazu ist ebenfalls in der Literatur beschrieben, dass PRP nach der Herstellung im antikoagulierten Zustand für nur acht Stunden stabil und anwendbar ist [120, 121].

Die Therapie kann als Salbe für Hautoberflächen und zum Unterspritzen der Haut Anwendung finden. HypPP wird im Bereich der Injektionstherapie verwendet, um die Hautverjüngung zu unterstützen [119]. Dazu wird HypPP, wie oben bereits beschrieben, mit einer Lösung von Thrombin/ Calciumchlorid kombiniert (s. Abb. 26.) und kann in tieferliegende Hautschichten (intradermal) injiziert werden.



**Abb. 26.:** Liquid Lifting mit HypPP-Faktoren

(Quelle der Gesichter: ©Wolfram Dellschau 36214 Nentershausen, Illustration: Carl. W. Röhrig; herzlichen Dank für die freundliche Genehmigung zur Verwendung)

Im Falle einer gewünschten Augmentation führt dies im Bereich der Injektionsstelle schnell zur Bildung einer Fibrin-Gel-Matrix. In dieser Fibrin-Gel-Struktur sind die in HypPP enthaltenen zellfreien Wachstumsfaktoren gespeichert und können schrittweise, kontinuierlich und kontrolliert an das Gewebe abgegeben werden [119, 213]. Darüber hinaus wirkt die Fibrin-Gel-Matrix als vorläufiges Gerüst, welches zusätzlich das Einwandern von Zellen, das Einsprossen neuer Blutgefäße sowie die Bildung neuer Hautgewebsstrukturen unterstützt. Im Endergebnis führt dies zu einer natürlich wirkenden Polsterung der Haut. Optional kann durch zusätzliches Beifügen von Fibrinogen zu HypPP das Volumen der Fibrin-Gel-Matrix und dadurch der Grad der polsternden Wirkung entsprechend des individuellen Bedarfs, verstärkt werden. Da Fibrinogen eine Halbwertszeit von 96 bis 120 Stunden besitzt (d.h. entsprechend der Blut-Konditionierungsdauer) ist es für Augmentationszwecke sinnvoll Fibrinogen beizufügen, um eine längerfristige Augmentation zu gewährleisten. Die Verwendung von HypPP als injizierbare Anwendung in dieser Form (z.B. in Kombination mit Thrombin/ Calciumchlorid) wird durch eine Vielzahl von Forschungsberichten unterstützt. Diese zeigten, dass die in vivo implantierte Fibrin-Matrix, Wachstumsfaktoren enthielt (z.B. VEGF), die lokales Wachstum von Blutgefäßen induzierten [214-218]. Die Vaskularisierung der Fibrinmatrix unterstützt somit die Integration in das Empfängergewebe durch die Migration und Proliferation von anderen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Endothelialzellen, Keratinozyten [219]. Daher präsentiert diese Technik eine Form von "in-vivo Tissue-Engineering", die an der Stelle der Injektion eine Gewebekonstruktion bzw. ein -wachstum erzeugt. So wird HypPP in Kombination mit Thrombin/ Calciumchlorid zur Faltenreduktion im Gesichtsbereich injiziert. Durch die entstandene Fibrin-Gel-Matrix entsteht auf natürlichem Wege eine Augmentation, die zur Straffung führt. Nachdem HypPP zellfrei ist und seine Komponenten nur aus patienteneigenem Blut entstehen, ist eine allergische Reaktion höchst unwahrscheinlich, im Gegensatz zu konventionellen Unterspritzungssubstanzen (Filler), die aus nicht autologen (tierischen oder synthetischen) Komponenten produziert werden. Gegenüber Platelet Rich Fibrin Matrix (PRFM) besteht der Vorteil darin, dass die Fibrinmatrix auch direkt im Gewebe durchgeführt werden kann, wodurch die Applikation erleichtert wird. Ein weiterer Vorteil

ist die bessere Kontrolle über die abgegebenen Faktoren, da sich diese im zellfreien Produkt nicht mehr verändern.

Auch auf dem wachsenden Gebiet der körpereigenen Fettinjektionen könnte HypPP eine weitere Anwendungsmöglichkeit finden. Die Kombination von HypPP mit körpereigenen Fettzellen könnte nach Injektion zu einer verbesserten Überlebensrate der transplantierten Fettgewebszellen führen, indem die Einsprossung neuer Blutgefäße und somit die Sauerstoffversorgung der Zellen begünstigt würde [119]. Diese Anwendungsgebiete wurden bisher weder wissenschaftlich untersucht, noch publiziert. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung gibt es noch keine ausreichende Studienlage. Jedoch gibt es vielversprechende erste Ergebnisse bei durchgeführten Heilversuchen, die einen Ausblick über die mögliche klinische Nutzung erlauben

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Teil dieser Arbeit dazu beigetragen hat, einen möglichen Therapieansatz voranzutreiben und die klinische Anwendung zu vereinfachen. Erste klinische Anwendungen sind im Rahmen von individuellen Heilversuchen bereits durchgeführt worden. Diese ersten klinischen Ergebnisse sind sehr vielversprechend und reproduzieren die guten in vitro Ergebnisse. Keine der individuellen Heilversuche zeigte bisher eine Form von Unverträglichkeit oder sonstigen Nebenwirkungen, so dass festgehalten werden kann, dass das Ziel eines personalisierten bioaktiven Wundverbandes ein Stück näher gerückt ist. Die Etablierung durch große Patientenstudien, um eine evidenzbasierte Therapie anbieten zu können, sind ausstehend.

## VII. Zusammenfassung

Chronisch ischämische Gewebe haben eine limitierte Fähigkeit, adaptive Angiogenese zu induzieren, obwohl diese Fähigkeit in anderen Geweben desselben Patienten erhalten ist [16]. Um dieses Problem kausal zu behandeln, wird im Rahmen des Projektes EmaCure ein möglicher Therapieansatz entwickelt, der es ermöglicht, aus Zellen von gesundem Gewebe produzierte autologe angiogene Proteine in das chronisch ischämische Gewebe zu transplantieren. Diese Arbeit untersucht den Effekt parakriner Proteine (= Wachstumsfaktoren; = angiogene Faktoren) durch hypoxische prä-Konditionierung von autologen peripheren Blutzellen (PBZ's) auf Sprouting-Angiogenese. Aufgrund der Tatsache, dass es bei Grunderkrankungen, wie z.B. der chronisch venösen Insuffizienz, Diabetes mellitus und pAVK zur Veränderung der extrazellulären Matrix kommt wurden parakrine Proteine, nachdem sie in entsprechender extrazellulärer Matrix (Collagen-Gel, Fibrin-Gel) aufgefangen wurden, auf die Fähigkeit getestet, die Neoangiogenese zu induzieren. Hierzu wurden folgende Hypothesen entwickelt:

- Periphere Blutzellen exprimieren unter hypoxischer Stimulation parakrine Proteine, die die Sprouting-Angiogenese regulieren.
- Die von peripheren Blutzellen exprimierten parakrinen Proteine können in der extrazellulären Matrix gespeichert und abgegeben werden.
- Die extrazelluläre Matrix reguliert biophysikalisch die Zusammensetzung der parakrinen Faktoren und hat folglich Auswirkungen auf die Sprouting Angiogenese.

Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf Speicherung und Freisetzung der parakrinen Proteine und deren biologische Funktion wurden *in vitro* proteinbiochemisch und mittels Microvessel Sprouting assay (aortic ring assay) untersucht. Das Aortic Ring Modell ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse von Sprouting-Angiogenese. Es gilt als Brücke zwischen *in vitro*- zu *in vivo*-Modellen [87].

In diesem Modell wurde die Aorta einer Maus unter mikroskopischer Vergrößerung in kleine Ringe präpariert und über acht Tage in Matrigel kultiviert. Nach Hinzugabe der Untersuchungsgruppe auf das Matrigel wurde in definierten Zeitabständen die Sprouting-Angiogenese mittels Mikroskopie quantifiziert. Weiterhin erfolgte eine Proteinquantifizierung mittels ELISA.

### **A. Parakrines angiogenes Potential hypoxisch prä-konditionierter Blutzellen und Einfluss der extrazellulären Matrix.**

Die Ergebnisse verifizieren die Hypothese, dass autologe periphere Blutzellen parakrine Proteine exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass das auf diese Weise gewonnene Sekretom sehr effektiv ist und auf sehr physiologische Art und Weise, unter Verwendung der kompletten angiogenen Kaskade, seine Wirkung entfaltet. Die Verwendung des isolierten rekombinanten Faktors VEGF, zeigt im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate, die die gesamten autologen angiogenen Faktoren enthält, eine signifikant niedrigere Rate an Sprouting-Angiogenese über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate zeigte außerdem bereits zwei Tage vor der negativ-Kontrolle AIM und der positiv-Kontrolle VEGF Sprouting-Angiogenese.

Des Weiteren konnte mittels VEGF-Blockierung gezeigt werden, dass die Sprouting-Angiogenese nur zum Teil von VEGF vermittelt wird und die Anwesenheit von anderen angiogenen Faktoren das Sprouting-Ergebnis verbessert. Es scheint so, dass VEGF vor allem in einer frühen Phase der Angiogenese entscheidend beteiligt ist.

Im direkten Vergleich der beiden extrazellulären Matrices zeigte sich, dass beide extrazellulären Matrices parakrine Proteine speichern und wieder abgeben können. Die Matrix Collagen-Gel zeigte, dass sie besser als Träger für parakrine Proteine geeignet ist. Das aus dem Collagen-Gel freigesetzte Releasate präsentierte eine signifikant höhere Sprouting-Angiogenese als das Releasate aus der Fibrinmatrix. Eine Erklärung hierfür ist das unterschiedliche Bindungsverhalten der extrazellulären Matrices. Durch die Proteinquantifizierung konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied bei der Bindung von PF-4 an die extrazelluläre Matrix festgestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Matrix Fibrin-Gel signifikant mehr PF-4 bindet, als die Matrix Collagen-Gel. Weitere Unterschiede im Bindungsverhalten der Matrices sind sehr wahrscheinlich. Der Einsatz von Collagen-Gel-Matrix könnte sich daher gut als Wundauflage eignen. Da Collagen ein Hauptkomponent in der Wundmatrix ist [39], lässt sich mutmaßen, dass es die Wundheilung zumindest nicht behindert, wenn es als Matrix exogen zugeführt wird.

Es wurde vermutet, dass die Aktivierung der Thrombozyten, durch Einleitung der Gerinnung mit einer erhöhten Ausschüttung von parakrinen Proteinen, wie z.B. PF-4, einhergeht. Trifft diese Vermutung zu könnte, dass aus der Alpha-Granula der Thrombozyten freigesetzte PF-4, in der Untersuchungsgruppe Serum ein Grund für das signifikant geringere Sprouting-Ergebnis, im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Collagen-Gel-Releasate, sein. Die erhöhte Konzentration von PF-4 in Serum war im Vorfeld bekannt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese erstellt werden, dass das Verfahren Platelet Rich Plasma (PRP), das seine Wirkung über supra-/unphysiologische Konzentration von Thrombozyten, sowie über die Gerinnungskaskade bedingte Aktivierung von Thrombozyten für die Anwendung bei chronischen Wunden nicht ideal geeignet scheint. Diese unbewiesene Hypothese bedarf weiterer Untersuchungen. Vorteile eines möglichen Therapieansatzes im Vergleich zur PRP-Methodik konnten in dieser Arbeit diskutiert werden.

Dieser erste Teil der Arbeit trägt durch die vorgestellten Ergebnisse dazu bei, dass der mögliche EmaCure-Therapieansatz mittlerweile besser erforscht ist. Es konnte ein klinischer One-Step-Bioreaktoren unter Verwendung von PBZ's und Collagen-Gel-Matrix entwickelt werden. Durch diese Bioreaktoren könnte eine klinische Anwendung erleichtert werden. Des Weiteren ist dieser Therapieansatz aktuell in Heilversuchen bereits in Anwendung. Die ersten klinischen Ergebnisse stimmen sehr zuversichtlich und reproduzieren die guten in vitro-Ergebnisse. Eine große randomisierte Patientenstudie steht noch aus.

## **B. Biophysikalische Regulation durch die extrazelluläre Matrix auf die Zusammensetzung der parakrinen Proteine und deren Auswirkung auf die Sprouting-Angiogenese.**

Durch die im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Fibrin-Gel-Matrix auf die Fähigkeit parakrine Proteine zu speichern und wieder abzugeben fiel auf, dass die Fibrinmatrix über eine Veränderung der Masse Einfluss auf die Anzahl und Länge von Sproutings nimmt. Das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war, zu zeigen, dass die Massenänderung von Fibrin biophysikalisch die Zusammensetzung der angiogenen Faktoren und somit in die physiologische Wundheilung regulatorisch eingreift.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine doppelte Masse der Fibrin-Gel (2cm<sup>3</sup>)-Matrix doppelt so viel PF-4 bindet. Dazu stimmig präsentiert sich ein Trend, dass eine inverse Korrelation der Fibrin-Masse mit der Anzahl der Sproutings besteht. Der Unterschied ist im Aortic Ring Assay allerdings nicht statistisch signifikant. In einem anderen durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten und publizierten Assay, dem tube formation Assay, konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden [92].

Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Konzentration von PF-4 sowohl Einfluss auf die Anzahl als auch auf die Länge der Sproutings hat. Mutmaßlich da PF-4 die Dissoziation von Endothelzellen steigert [172] oder aufgrund der bekannten Bindung von PF-4 an VEGF [171]. Paradoxerweise geht eine zu niedrige/ fehlende Konzentration von PF-4 in der PF-4-Blockgruppe, mit einer geringeren Anzahl an Sproutings im Aortic Ring Assay einher. Höchstwahrscheinlich, da die fehlende Dissoziation von Endothelzellen die Initiation des Sprouting Vorgangs blockiert. Ebenfalls in einem durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten tube formation Assay zeigte sich konträr, dass die Blockierung von PF-4, eine im Verhältnis gute Angiogenese erzeugte [92]. Daher wurde die Hypothese entwickelt, dass der Faktor PF-4 eine entscheidende Rolle im Sprouting-Angiogenese-Prozess hat. Während diese Eigenschaft im tube formation Assay nicht benötigt wird, da keine Form von Sprouting-Angiogenese getestet wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abhängigkeit des Sproutings von der PF-4-Aktivität wahrscheinlich nicht linear abläuft,

sondern eine absolute Hemmwirkung bei sehr niedrigen und hohen Konzentrationen ausgeübt wird [92]. So ist PF-4 als anti-angiogener Faktor nichtsdestotrotz ein essentieller Bestandteil für eine pro-angiogene (Sprouting-) Wirkung.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Fibrin den Phasenübergang zwischen Hämostase und Angiogenese/ Proliferation [92] über die Veränderung der Masse und damit einhergehend biophysikalisch die Zusammensetzung von angiogenen Faktoren reguliert. Dies kann durch den Einfluss der unterschiedlichen Fibrin-Massen auf die Sprouting-Anzahl und -Länge in dieser Arbeit gezeigt werden. Eine Massenänderung von Fibrin ist Bestandteil jeder physiologischen Wundheilung. Es ist wahrscheinlich, dass der gezeigte Einfluss von PF-4 nicht alleine für diesen Effekt verantwortlich ist. So wurde bereits die VEGF-Bindung von unserer Arbeitsgruppe diskutiert [92]. Ebenfalls denkbar ist, dass andere Faktoren eine Rolle spielen. Ein Grund für die unterschiedliche Bindung der Fibrin-Massen könnte sein, dass Änderungen in der Konzentration die Proteinfaktor Retention/ Freisetzungskinetik durch Veränderung der Porengröße und der Verfügbarkeit von Faktor-Bindungsstellen beeinflusst [92, 178].

Außerdem ist zu beachten, dass unter Verwendung der gesamten Kaskade, die Balance der pro- und anti-angiogenen Faktoren entscheidend für die Angiogenese ist. Diese Balance und die damit verbundene Wundheilung wird über die Bindungen der parakrinen Proteine an Fibrin beeinflusst. Zusammengefasst bestätigen wir unter Verwendung der hier gezeigten Daten, dass das Fibringerüst initial eine anti-angiogene Barriere schafft [92]. Hierdurch wird zunächst die Hämostase unterstützt, um dann nach fibrinolytisch (Volumenreduktion) vermittelter Disinhibition die Angiogenese zu unterstützen [92]. Während der Fibrinolyse werden z.B. angiogene Fibrinfragmente (z.B. FNE) freigesetzt, die synergistisch mit anderen pro-angiogenen Faktoren, wie VEGF, bFGF wirken [92, 179].

Diese Ergebnisse sind ebenfalls von klinischer Bedeutung und erklären grundlegend die Notwendigkeit und Hintergründe eines chirurgischen Débridement. Durch das Abtragen von Fibrinbelägen wird die Wundheilung weniger heraus gezögert, indem der anfängliche inhibitorische Effekt des Fibringerüsts auf die Phase der Proliferation/ Angiogenese reduziert wird. Die Ergebnisse erweitern das Verständnis von Zell-Matrix-Interaktion im Rahmen von Wundheilungsprozessen.

## VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken, die direkt oder indirekt zur Entstehung meiner Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meiner gesamten Familie danken.

Besonders meinen Eltern, Elke und Ralf, meinem Bruder Julian und meiner Freundin Christiane gilt ein besonderer Dank dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich in jeder Lebenslage bedingungslos unterstützt haben.

Herrn Prof. Schilling und Herrn Dr. Hadjipanayi möchte ich für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung danken. Durch Ihre Ratschläge, Ideen, ihren unermüdlichen Einsatz die Arbeit voranzutreiben und die gute und schnelle Kommunikation untereinander machte das Arbeiten mit Ihnen zu einer großen Freude. Ich bedanke mich für eine weit über die Doktorarbeit hinausgehende Unterstützung/ Förderung und das Überlassen eines besonders spannenden Themengebietes.

Auf keinen Fall möchte ich Herrn Dr. Kuekrek vergessen, der mir bei meiner Arbeit im Labor eine große Hilfe war und mit dem ich in sehr angenehmer Zusammenarbeit das Projekt erfolgreich beenden konnte.

Frau Hopfner und Frau Kirsch danke ich für die gute Einführung ins Labor und für ihr offenes Ohr bei Problemen und für jegliche Hilfestellungen.

Herrn Kai Schüler danke ich für das Korrekturlesen.

Natürlich möchte ich auch dem gesamten EmaCure Team danken. Durch die Fortschritte und das persönliche Engagement jedes Einzelnen konnten wir gemeinsam mit dem Projekt wachsen.

Herzlichen Dank.

## IX. Literaturverzeichnis

1. Risau W, *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**: p. 671-674.
2. Risau W, Flamme I, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol 1995. **11**: p. 73-91.
3. Herting AT, *Angiogenesis in the early human chorion*. Contrib Embryol Carnegie Inst, 1953. **25**: p. 37-43.
4. Liekens S, Clercq ED, Neyts J, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. Biochemical Pharmacology 2001. **61**: p. 253-270.
5. Baker M, Stephen DR, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K, *Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis*. Nature Protocols, 2011. **7**(1): p. 89-104.
6. Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE, *Integrins in angiogenesis: multitalented molecules in a balancing act*. Cell Tissue Res, 2003. **314**: p. 131-144.
7. Ferrara N, Kerbel RS, *Angiogenesis as a therapeutic target*. Nature, 2005. **438**: p. 967-974.
8. Nicosia RF, Ottinetti A, *Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro*. Lab Invest, 1990. **63**: p. 115-122.
9. Carmeliet P, *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **174**: p. 2336-2342.
10. Gosain A, DiPietro LA, *Aging and wound healing*. World J Surg, 2004. **28**: p. 321-326.
11. Vailhé B, Vittet D, Feige JJ, *In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis*. 2001. **81**: p. 439.
12. Ribatti D, Crivellato E, *"Sprouting angiogenesis", a reappraisal*. Developmental Biology, 2012. **372**: p. 157–165.
13. Zhang G, Dass CR, Sumithran E, Di Girolamo N, Sun LQ, Khachigian LM, *Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**: p. 683-696.

14. Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ, *Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules*. Int J Oncol, 1998. **12**: p. 749-757.
15. Ausprunk DH, Folkman J, *Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis*. Microvasc Res, 1977. **14**: p. 53-65.
16. Hadjipanayi E, Schilling AF, *Hypoxia-based strategies for angiogenic induction*. Organogenesis Landes Bioscience, 2013. **9**: p. 1-12.
17. Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ, *Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor*. Clin Cancer Res., 2000. **6(7)**: p. 2941-2950.
18. Short RHD, *Alveolar epithelium in relation to growth of the lung*. Phil Trans R Soc Lond B, 1950. **235**: p. 35-86.
19. Patan S, Haenni B, Burri PH, *Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM)*. Microvasc Res, 1997. **53**: p. 33-52.
20. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V, *Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance*. Developmental Dynamics, 2004. **231**: p. 474-488.
21. Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG, *Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion*. Lab Invest., 1996. **74(4)**: p. 771-780.
22. Ribatti D, Folkman J, *A pioneer in the study of angiogenesis*. Angiogenesis, 2008. **11**: p. 3-10.
23. Folkman J, *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**: p. 273-286.
24. Cassavaugh J, Lounsbury KM, *Hypoxia-mediated biological control*. J Cell Biochem, 2011. **112**: p. 735-744.
25. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M,

- Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM, *Sorafenib in advanced clear- sell- renal- cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**: p. 125-134.
26. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F, *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**: p. 2335–42.
27. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI, *Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**: p. 16-24.
28. Clark RA, *Basics of cutaneous wound repair*. J Dermatol Surg Oncol, 1993. **19(8)**: p. 693-706.
29. Singer AJ, Clark RA, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med. , 1999 **341(10)**: p. 738-746.
30. Dvorak HF, *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med., 1986. **315(26)**: p. 1650-1659.
31. Arnold F, West DC, *Angiogenesis in wound healing*. Pharmacol Ther., 1991. **52(3)**: p. 407-422.
32. Hadjipanayi H, Moog P, Isenburg S, Schilling AF, *Blutderivate: Handbuch für Falten-und Weichteilunterspritzung (eingereicht)*. Springer Verlag, 2015.
33. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, et al., *Definitions and quidlines for assessment of wounds and evaluation of healing*. Arch Dermatol, 1994. **130**: p. 489-493.
34. Vogt PM, *Praxis der Plastischen Chirurgie*. Lehrbuch Springer Verlag, 2011: p. 5.
35. Mathieu D, Linke JC, Wattel F, *Non-healing wounds. In: Handbook on hyperbaric medicine*. Netherlands: Springer, 2006: p. 401-427.
36. Guo S, DiPietro LA, *Factors Affecting Wound Healing*. J Dent Res, 2010. **89(3)**: p. 219-229.

37. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, *Duale Reihe Biochemie*. Thieme Verlag, 2008. **2**: p. 736-745.
38. Broughton G, Janis JE, Attinger CE, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**: p. 12-34.
39. Campos AC, Groth AK, Branco AB, *Assessment and nutritional aspects of wound healing*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**: p. 281-288.
40. Simon MC, Keith B, *The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**: p. 285–296.
41. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ, *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**: p. 271–275.
42. Semenza GL, *Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia-inducible factor 1*. Exp Physiol, 2007. **92**: p. 988-991.
43. Loges S, Roncal C, Carmeliet P, *Development of targeted angiogenic medicine*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009. **7**: p. 21–33.
44. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ, *EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**: p. 43–54.
45. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, *Hypoxia inducible factor alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel–Lindau tumor suppressor protein*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 25733–25741.
46. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ, *Oxygen sensing by metazoans the central role of the HIF hydroxylase pathway*. Mol Cell, 2008. **30**: p. 393-402.
47. Semenza GL, *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis*. Curr Opin Genet Dev 1998. **8**: p. 588-594.
48. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE, *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 30 to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci, 1991. **88**: p. 5680–5684.

49. Nuzzi PA, Lokuta MA, Huttenlocher A, *Analysis of neutrophil chemotaxis*. Methods Mol Biol., 2007. **370**: p. 23-36.
50. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE, *Macrophage-induced neutrophil apoptosis*. J Immunol, 2000. **165**: p. 435-441.
51. Mosser DM, Edwards JP, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**: p. 958-969.
52. Paul Hartmann AG: Wissenschaftliche Beratung: Prof. Dr. med. Pavel Brychta, Prof. Dr. med. Günther Germann, Dr. med. Andreas Gericke, Prof. Dr. med. Walter O. Seiler, Dr. med. Jörg Tautenhahn, Prof. Dr. med. Helmut Winter, *Kompendium Wunde und Wundbehandlung*. Hartmann medicaedition, 2008. **3**.
53. Romo T, Pearson JM, *Wound Healing, Skin*. Emedicine.com., 2005.
54. Kujath P, Michelsen A, *Wunden – von der Physiologie zum Verband*. Dtsch Arztebl 2008. **105**: p. 239-48.
55. Lorenz HP, Longaker MT, *Wounds: Biology, Pathology, and Management*. Stanford University Medical Center., 2003.
56. Sabiston D, *The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. Textbook of Surgery, 1997. **15**: p. 209.
57. Dreifke MB, Jayasuriya AA, Ambalangodage C, Jayasuriya C, *Current wound healing procedures and potential care*. Materials Science and Engineering, 2015. **C48**: p. 651–662.
58. Korting HC, Schöllmann C, White RJ, *Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment*. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 2011. **25**: p. 130–137.
59. Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V., *Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz*. AWMF online: Das Portal der wissenschaftlichen Medizin 2012. **Version I**: p. 1-279.
60. Wild T, Auböck J, *Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*. Springer Verlag, 2007.
61. Ho TK, Abraham DJ, Black CM, Baker DM, *Hypoxia inducible factor 1 in lower limb ischemia*. Vascular, 2006. **14**: p. 321-327.

62. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF, *Impaired wound healing*. Clin Dermatol, 2007. **25**: p. 19-25.
63. Vossen S, Nowak T, Steinke T, Luther B, *Wundheilung: Mechanismen, Interventionen und Praxistipps zum diabetischen Fuß*. Apothekenmagazin 2005. **23(3)**: p. 40-47.
64. Riedel K, Ryssel H, Koellensperger E, Germann G, Kremer T, *Pathophysiologie der chronischen Wunde*. Der Chirurg, 2008. **79(6)**: p. 526-534.
65. Falanga V, Kirsner RS, *Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells*. J Cell Physiol, 1993. **154**: p. 506-510.
66. Olszewska-Pazdrak B, Hein TW, Olszewska P, Carney DH, *Chronic hypoxia attenuates VEGF signaling and angiogenic responses by downregulation of KDR in human endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**: p. 1162-1170.
67. Rao CN, Ladin DA, Liu YY, et al., *Alpha 1-antitrypsin is degraded and nonfunctional in chronic wounds but intact and functional in acute wounds: the inhibitor protects fibronectin from degradation by chronic wound fluid enzymes*. J Invest Dermatol, 1995. **105**: p. 572-578.
68. Grinnell F, Zhu M, *Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin*. J Invest Dermatol, 1996. **106**: p. 335 - 341.
69. Falanga V, Grinelli F, Gilchrest B, Maddox YT, Moshell A, *Workshop on the pathogenesis of chronic wounds*. J Invest Dermatol. , 1994. **102(1)**: p. 125-127.
70. Hasan A, Murata H, Falabella A, Ochoa S, Zhou L, Badiavas E, Falanga V, *Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor-beta 1*. J Dermatol Sci. , 1997. **16(1)**: p. 59-66.
71. Agren MS, Steenfos H, Dabelsteen S, Hansen JB, Dabelsteen E, *Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent*. J Invest Dermatol., 1999. **112(4)**: p. 463-469.
72. Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW, *Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity*. J Invest Dermatol., 2000 **115(2)**: p. 225-233.

73. Kröger K, Dissemond J, Storck M, Risse A, Engels P, *Chronische Wunden: Die Hypoxie verhindert die Heilung*. Wund Management, 2012. **5**: p. 212-217.
74. Jünger M, Hahn M, Klyscz T, Steins A, *Microangiopathy in the pathogenesis of chronic venous insufficiency*. Curr Probl Dermatol. , 1999. **27**: p. 124-129.
75. Franzeck UK, Bollinger A, Huch R, Huch A, *Transcutaneous oxygen tension and capillary morphologic characteristics and density in patients with chronic venous incompetence*. Circulation., 1984. **70(5)**: p. 806-811.
76. Jünger M, Steins A, Hahn M, Häfner HM, *Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI)*. Microcirculation, 2000. **7(6)**: p. 3-12.
77. Mani R, Gorman FW, White JE, *Transcutaneous measurements of oxygen tension at edges of leg ulcers: preliminary communication*. J R Soc Med. , 1986. **79(11)**: p. 650-654.
78. Stücker M, Schöbe MC, Hoffmann K, Schultz-Ehrenburg U, *Cutaneous microcirculation in skin lesions associated with chronic venous insufficiency*. Dermatol Surg. , 1995. **21(10)**: p. 877-882.
79. Bollinger A, Hoffmann U, Franzeck UK, *Microvascular changes in arterial occlusive disease: target for pharmacotherapy*. Vasc Med., 1996. **1(1)**: p. 50-54.
80. Greenman RL, Panasyuk S, Wang X, Lyons TE, Dinh T, Longoria L, Giurini JM, Freeman J, Khaodhiar L, Veves A, *Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot*. Lancet. , 2005 **366**: p. 1711-1717.
81. Jörneskog G, Brismar K, Fagrell B, *Skin capillary circulation is more impaired in the toes of diabetic than non-diabetic patients with peripheral vascular disease*. Diabet Med., 1995. **12(1)**: p. 36-41.
82. Tooke JE, Brash PD, *Microvascular aspects of diabetic foot disease*. Diabet Med., 1996. **13** p. 26-29.
83. Bellacen K, Lewis EC, *Aortic Ring Assay*. Journal of Visualized Experiments, 2009. **33**: p. 1-2.
84. Aplin AC, Fogege E, Zorzi P, Nicosia RF, *The aortic ring model of angiogenesis*. Methods Enzymol, 2008. **443**: p. 119-136.

85. Nicosia RF, Zorzi P, Ligresti G, Morishita A, Aplin AC, *Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model*. Int J Dev Biol, 2011. **55**: p. 447-453.
86. Hadjipanayi E, Bauer A, Moog P, Salgin B, Kükrek H, Fersch B, Hopfner U, Meissner T, Schlüter A, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF, *Cell-free Carrier System for Localised Delivery of Peripheral Blood Cell-Derived Engineered Factor Signaling: Towards Development of a One-Step Device for Autologous Angiogenic Therapy*. Journal of Controlled Release, 2013. **169**: p. 91–102.
87. Nicosia RF, *The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery*. J Cell Mol Med, 2009. **13**: p. 4113-4136.
88. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J, *Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopie, ultrastructural, and radioautographic studies*. In vitro, 1982. **18**: p. 538-549.
89. Kawasaki S, Kure T, Chang JH, et al., *Capillary growth of rat aortic segments cultured in collagen gel without serum*. Acta Pathol Jpn., 1989. **39**: p. 712-718.
90. Zhu WH, Iurlaro M, MacIntyre A, et al., *The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF and VEGF-induced angiogenic sprouting*. Angiogenesis, 2003. **6**: p. 193-199.
91. De Rossi G, Scotland RS, Whiteford JR, *Critical Factors in Measuring Angiogenesis using the Aortic Ring Model*. J Genet Syndr Gene Ther Author manuscript, 2013. **4**: p. 1-8.
92. Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P, Bauer AT, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, Kirchhoff K, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF, *The Fibrin Matrix regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control*. PLoS One, 2015. **10(8)**: p. 1-20.
93. Chen WT, Wang JY, *Specialized surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization*. Annals New York Academy of Sciences, 1999. **878**: p. 361–371.
94. Maquoi E, Sounii NE, Devy L, Olivier F, Frankenne F, Krell HW, Grams F, Foidart JM, Noel A; *Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a*

- pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. Clin Cancer Res, 2004. 10: p. 4038-4047.*
95. Lichtenauer M, Mildner M, Hoetzenecker K, Zimmermann M, Podesser BK, Sipos W, Berenyi E, Dworschak M, Tschachler E, Gyongyosi M, Ankersmit HJ, *Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. Basic Res Cardiol, 2011. 106: p. 1283-1297.*
96. Baker AH, Edwards DR, Murphy G, *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci, 2002. 115: p. 3719– 3727.*
97. Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Cataldo D, Foidart JM, *Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. J Clin Pathol, 2004. 57: p. 577–584.*
98. Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss SJ, *MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. J Cell Biol, 2004. 167: p. 757–767.*
99. Monea S, Roberts B, Marcus SG, Shamamian P, Mignatti P, *Roles of MT1-MMP in the regulation of cell surface proteolysis. Ann NY Acad Sci, 1999. 878: p. 703–706.*
100. Baciuc PC, Suleiman EA, Deryugina EI, Strongin AY, *Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro-alpha v integrin regulates cross-talk between alpha v beta 3 and alpha 2 beta 1 integrins in breast carcinoma cells. Exp Cell Res, 2003. 291: p. 167–175.*
101. Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG, *ECM regulates MT1-MMP localization with beta 1 or alpha v beta 3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. J Cell Biol, 2002. 159: p. 509–521.*
102. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. J Biol Chem, 1994. 269: p. 9352–9360.*

103. Zhu WH, Guo X, Villaschi S, Francesco NR, *Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinase in the rat aorta model of angiogenesis.* Lab Invest, 2000. **80**: p. 545-555.
104. Aplin AC, Zhu WH, Fogele E, Nicosia RF, *Vascular regression and survival are differentially regulated by MT-1 MMP and TIMPs in the aortic ring model of angiogenesis.* Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**: p. 471-480.
105. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity.* J Cell Physiol, 1998. **177**: p. 439-452.
106. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J, *Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine.* J Am Coll Cardiol, 2007. **49**.
107. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N, *Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes.* J Biol Chem, 1997. **272**: p. 23659–23667.
108. Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF, *Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 29979–29985.
109. Ribatti D, *History of Research on Angiogenesis.* Chem Immunol Allergy, 2014. **99**: p. 1-14.
110. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.* American Journal of Pathology, 1995. **146**: p. 1029–39.
111. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H, *Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance.* J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **27**: p. 838–844.
112. Villaschi S, Nicosia RF, *Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury.* Am J Pathol, 1993. **143**: p. 181-190.
113. Shojaei F, Ferrara N, *Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies.* Drug Resist Updat, 2008. **11**: p. 219-230.

114. Sahni A, Francis CW, *Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation*. Blood, 2000. **96**: p. 3772-3778.
115. Sahni A, Odrlijin T, Francis CW, *Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 7554-7559.
116. Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR, *Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 30215-30221.
117. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA, *Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2013. **110 (112)**: p. 4563-4568.
118. Amelot AA, Tagzirt M, Ducouret G, Kuen RL, Le Bonniec BF, *Platelet factor 4 (CXCL4) seals blood clots by altering the structure of fibrin*. J Biol Chem, 2007. **282**: p. 710-720.
119. Hadjipanayi E, Schilling AF, *Regeneration through autologous hypoxia preconditioned plasma*. Organogenesis, 2014. **10**: p. 164-169.
120. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M, *Platelet- rich plasma:a review of biology and Applications in Plastic Surgery*. Plast. Reconstr. Surg., 2006. **118**: p. 147-159.
121. Marx RE, *Platelet-rich plasma (PRP): What ist PRP and what is not PRP?* Implant Dent., 2001. **10**: p. 225.
122. Akhundov K, Pietramaggiori G, Waselle L, Darwiche S, Guerid S, Scaletta C, Hirt-Burri N, Applegate LA, Raffoul WV, *Development of a cost- effective method for platelet- rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing*. Annals of Burns and Fire Disasters, 2012. **25**: p. 207-213.
123. Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, Orlandi A, *Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation*. Tissue Eng Part C Methods. , 2009. **15(4)**: p. 625-634.
124. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT, *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. thromb Haemast, 2004. **91**: p. 4.

125. Anitua E, *Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants*. J Oral Implantol, 1999. **14**: p. 529.
126. Sclafani AP, *Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery*. Facial Plast Surg. , 2009. **25(4)**: p. 270-276.
127. Hom DB, *New Developments in wound healing relevant to facial plastic surgery*. Arch Facial Plast Surg., 2008. **10**: p. 402-406.
128. Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G, *Growth factor content in PRP and their applicability in medicine*. J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**: p. 3-22.
129. van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA, *Platelet-Rich Plasma: Quantification of Growth Factor Levels and the Effect on Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells* Tissue Eng, 2006. **12**: p. 3067-3073.
130. Fabi S, Sundaram H, *The Potential of Topical and Injectable Growth Factors and Cytokines for Skin Rejuvenation*. Facial Plast Surg, 2014. **30**: p. 157-171.
131. Sclafani AP, McCormick SA, *Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix*. Arch Facial Plast Surg. , 2012. **14(2)**: p. 132-136.
132. Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L, Garcia J, *Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds*. Cochrane Database Syst Rev, 2012: p. 1-56.
133. Martínez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Solà I, Bolibar I, Angel Expósito J, Rodríguez L, García J, *Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review*. Transfusion, 2009. **49**: p. 44-56.
134. Nikolidakis D, Jansen JA, *The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**: p. 249-258.
135. De Pascale MR, Sommese L, Casmassimi A, Napoli C, *Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update*. Transfusion Medicine Reviews, 2014.
136. Fabi S, Sundaram H, *The potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation*. Facial Plast Surg. , 2014. **30(2)**: p. 157-171.
137. Nagata MJ, Messori MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, Deliberador TM, de Melo LG, *Effectiveness of two methods for preparation of*

- autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits*. 2010. **4**: p. 395-402.
138. Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK, *Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis*. *Eplasty*, 2011. **11**: p. e38.
139. Paola Romina Amable, Rosana Bizon Vieira Carias, Marcus Vinicius Telles Teixeira, italo da Cruz Pacheco, Ronald Jose Farias Correa do Amaral, Jose Mauro Granjeiro, Rodovan Borojevic, *Platelet- rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2013. **4**: p. 67.
140. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P, *Not every PRP- gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, Regen PRP-kit, Plateltex and one manual procedere*. *Vox Sang*, 2009. **97**: p. 110-118.
141. Castillo TN, Pouliot M, Kim HJ, Dragoo JL, *Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems*. *Am J Sports Med*, 2011. **39(2)**: p. 266-271.
142. Zenker S, *Platelet rich plasma (PRP) for facial rejuvenation*. *J. Méd. Esth. et Chir. Derm.*, 2010. **37**: p. 179-183.
143. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M, *The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts*. *Clin Oral Implants*, 2006. **17**: p. 212-219.
144. Schulte WV, *Die Eigenblutfüllung: eine neue Methode zur Versorgung größerer Knochendefkte nach intraoralen Eingriffen*. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1960. **12**: p. 910-914.
145. Schulte WV, *Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung Für die primäre Heilung von Kieferknochen*. München: Carl Hans Verlag 1964.
146. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, *A new technique for hemodilution, preparation of autologous plaetelt- rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery*. *Int J Artif Organs*, 1987. **10**: p. 47-50.
147. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B, *Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review*. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2008. **1**: p. 165-174.

148. Yamamoto K, Hayashi J, Miyamura H, Eguchi S, *A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery*. Cardiovascular Surgery, 1996. **4(1)**: p. 9-14.
149. Whitman DH, Berry RL, Green DM, *A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1998. **56**: p. 1217–1218.
150. Marx RE, Carlson E, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR, *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. . Oral Surgery Endod 1998. **85(6)**: p. 638-646.
151. Shin MK, Lee JW, Kim YI, Kim Yo, Seok H, Kim NI, *The effects of platelet-rich clot releasate on the expression of MMP-1 and type I collagen in human adult dermal fibroblasts: PRP is a stronger MMP-1 stimulator*. Mol Biol Rep, 2014. **41**: p. 3-8.
152. Brill A, Elinav H, Varon D, *Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2004. **63**: p. 226-235.
153. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K, *Proliferation promoting effect of platelet- rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts*. Plast Reconstr Surg, 2008. **122(5)**: p. 1352-1360.
154. Modaresi A, *Platelet Rich Plasma (PRP) improves Fat Grafting Outcomes*. World J Plast Surg, 2013. **2(1)**: p. 6-13.
155. Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, et al, *Application of platelet- rich plasma in plastic surgery: clinica and in vitro evaluation*. Tissue Eng Part C Methods., 2009. **15**: p. 1-9.
156. Fa-Ming Chen, Yi-Min Zhao, Yan Jin, Santago Shi, *Prospects for translational regenerative medicine*. Biotechnology Advances, 2011.
157. Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, *Healing of musculoskeletal tissues*. Fractures in Adults, 1996: p. 261-304.
158. Anderson JM, *The cellular cascades of wound healing*. Bone Engineering 2000: p. 81-93.

159. Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, Bielecki T, *Microbicidal properties of leukocyte- and platelet- rich plasma/fibrin: new perspectives*. J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**: p. 43S-52S.
160. Zavadil DP, Saterlee CC, Costigan JM, Holt DW, Shostrom VK, *Autologous platelet gel and platelet poor plasma reduce pain with total shoulder arthroplasty*. J Extra Corpor Technol, 2007. **39**: p. 177-182.
161. Aggarwal AK, Shashikanth VS, Marwaha N, *Platelet rich olasma prevents blood loss and pain and enhances early functional outcome after total knee arthroplasty: a prospektive randomised controlled study*. Int Orthop, 2014. **38**: p. 387-395.
162. Hackel D, Pflücke D, Neumann A, Viebahn J, Mousa S, Wischmeyer E, et al., *The connection of monocytes and reactive oxgen species in pain*. PLoS One, 2013. **8**.
163. Kuffler DP, *Platelet- rich plasma and the elimination of neuropathic pain*. Mol Neurobiol, 2013. **48**: p. 315-332.
164. de Paulis A, Prevete N, Fiorentino I, Rossi FW, Staibano S, Montuori N, Ragno P, Longobardi A, Liccardo B, Genovese A, Ribatti D, Walls AF, Marone G, *Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils*. J Immunol, 2006. **177**: p. 7322-7331.
165. Kusumanto YH, Dam WH, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH, *Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor*. Angiogenesis, 2003. **6**: p. 283-287.
166. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tudor RM, Voelkel NF, *In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation*. Am J Physiol 1998. **275**: p. 1054-1061.
167. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP, *Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis*. Arch Surg, 1999. **134**: p. 1325-1331.
168. Puxeddu I, Alian A, Piliponsky AM, Ribatti D, Panet A, Levi-Schaffer F, *Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**: p. 628-636.

169. Briquet-Laugier V, Lavenu-Bombled C, Schmitt A, Leboeuf M, Uzan G, Dubart-Kupperschmitt A, Rosa JP, *Probing platelet factor 4 alpha-granule targeting*. J Thromb Haemost, 2004. **2**: p. 2231-2240.
170. El Golli N, Issertial O, Rosa JP, Briquet-Laugier V, *Evidence for a granule targeting sequence within platelet factor 4*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 30329-30335.
171. Bikfalvi A, *Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30(3)**: p. 379-385.
172. Jamison J, James HC, Wells A, *PKCd Regulates Force Signaling during VEGF/CXCL4 Induced Dissociation of Endothelial Tubes*. Plos One, 2014. **9(4)**: p. 1-8.
173. Aidoudi S, Bikfalvi A, *Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis*. Thromb. Haemost., 2010. **104(5)**: p. 941-948.
174. Krukemeyer MG, Spiegel HU, *Chirurgische Forschung*. Thieme Verlag, 2005. Version 6,05: p. 113.
175. Monroe DM, Hoffman M, *The clotting system - a major player in wound healing*. Haemophilia, 2012. **18**: p. 11-16.
176. Reinke JM, Sorg H, *Wound repair and regeneration*. Eur Surg Res, 2012. **49**: p. 35-43.
177. Thompson WD, Harvey JA, Kazmi MA, Stout AJ, *Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing*. J Pathol, 1991. **165**: p. 311-318.
178. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ, *Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery*. J Control Release, 2000. **64**: p. 91-102.
179. Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Thompson WD, Stirk CM, Lewis CE, *Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro*. Angiogenesis 2001. **4**: p. 269-275.
180. Mustoe TA, O`Shaughnessy K, Kloeters O, *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. PlastReconstrSurg., 2006. **117**: p. 355-415.

181. Falanga V, *Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds*. Wound Repair Regen., 2000. **8(5)**: p. 347-352.
182. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al., *Wound bed preparation: a systematic approach to wound management*. . Wound Repair Regen., 2003. **11**: p. 1-28.
183. Ayello EA, Dowsett C, Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Harding K, et al., *TIME heals all wounds*. Nursing, 2004. **34(4)**: p. 36-41.
184. Turner TD, *A look at wound dressings*. . Health and Social Service Journal. , 1979: p. 529-531.
185. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert-Koch-Institut, *Infektionsprävention in Heimen*, Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2005.
186. Horch RE: „Panta rhei“: *Vakuumtherapie im Wandel - Ein Vorwort zum Supplement „Drei-Länder-Kongress“ Nürnberg 2006*. Zentralbl Chir, 2006. **131**: p. 1-2.
187. Tautenhahn J, Bürgen T, Lippert H, *Der Stand der Vakuumversiegelung*. . Chirurg, 2004. **75**: p. 492-497.
188. Peinemann F, Sauerland S, *Vakuumtherapie von Wunden: Systematische Übersicht randomisierter kontrollierter Studien*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108(22)**: p. 381-389.
189. Kröger K, Gerber V, Schwarzkopf A, *Evidenzbasierte Wundversorgung: Wir irren uns empor*. Artikel für die Initiative Chronische Wunden e. V. [http://www.wundcongress.de/files/iwc2011\\_kroeger.pdf](http://www.wundcongress.de/files/iwc2011_kroeger.pdf).
190. Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA, *Innate immunity and angiogenesis*. Circ Res, 2005. **96**: p. 15–26.
191. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, Isner JM, *Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF- 1alpha/VP16 hybrid transcription factor*. Circulation, 2000. **102**: p. 2255-2261.
192. Rey S, Semenza GL, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling*. Cardiovasc Res, 2010. **86**: p. 236-342.

193. Fraisl P, Aragonés J, Carmeliet P, *Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**: p. 139-152.
194. Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, Qin SL, Hamano K, *Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**: p. 590-595.
195. Wei L, Fraser J., Lu ZY, Hu X, Yu SP, *Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats*. Neurobiol Dis, 2012. **46**: p. 635-645.
196. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C, *Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation*. PLoS One, 2009. **4**: p. 5643.
197. Ben-Shoshan J, Schwartz S, Luboshits G, Maysel-Auslender S, Barzelay A, Polak-Charcon S, Tzahor E, Barshack I, Barak A, Levkovitch-Verbin H, et al., *Constitutive expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties*. Stem Cells, 2008. **26**: p. 2634-2643.
198. Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, Chang EI, Lin SE, Bastidas N, Aarabi S, Chan DA, Freedman ML, Giaccia AJ, et al., *Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia*. Circulation, 2007. **116**: p. 2818-2829.
199. Hadjipanayi E, Brown RA, Mudera V, Deng D, Liu W, Cheema U, *Controlling physiological angiogenesis by hypoxia-induced signaling*. Journal of Controlled Release 2010. **146**: p. 309–317.
200. Cheema U, Brown RA, Alpa B, MacRobert AJ, *Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **65**: p. 177 – 186.

201. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu TG, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM, *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 31189-31195.
202. Hadjipanayi E, Cheema U., Mudera V, Deng D, Liu W, Brown RA, *First implantable device for hypoxia-mediated angiogenic induction*. Journal of Controlled Release, 2011: p. 217–224.
203. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis, CE, *Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy*. American Journal of Pathology, 2003. **163**: p. 1233-1243.
204. Panutsopoulos D, Zafiropoulos A, Krambovitis E, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Spandidos DA, *Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression*. J Transl Med, 2003. **1**: p. 1-11.
205. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M, *Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF*. Cytokine, 1999. **11**: p. 416-423.
206. Griga T, Gutzeit A, Sommerkamp C, May B, *Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**: p. 175-179.
207. Pang C, Gao Z, Yin J, Zhang J, Jia W, Ye J, *Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**: p. 313-322.
208. Montesano R, Mossaz A, Ryser JE, Orci L, Vassalli P, *Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix*. J Cell Biol, 1984. **99**: p. 1706-1715.
209. Bouchentouf M, Paradis P, Forner KA, Cuerquis J, Boivin MN, Zheng J, Boulassel MR, Routy JP, Schiffrin EL, Galipeau J, *Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction*. Cell Transplant, 2010. **19**: p. 369-386.
210. Mildner M, Hacker S, Haider T, Gschwandtner M, Werba G, Barresi C, Zimmermann M, Golabi B, Tschachler E, Ankersmit HJ, *Secretome of*

- peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing*. PLoS One, 2013. **8(3)**(3): p. 1-8.
211. Tenan M, Fulci G, Albertoni M, Diserens AC, Hamou MF, El-Atifi-Borel M, Feige JJ, Pepper MS, Van Meir EG, *Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells*. J Exp Med, 2000. **191**: p. 1789-1798.
212. Hu CJ, Chen SD, Yang DI, Lin TN, Chen Cm, Huang TH, Hsu CY, *Promotor region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**: p. 1519-1526.
213. Hadjipanayi E, Cheema U, Hopfner U, Bauer A, Machens HG, Schilling AF, *Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling*. Journal of Controlled Release 2012. **161**: p. 852–860.
214. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, Wood J, Burri PH, Hubbell JA, Zisch AH, *Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth*. Circ Res., 2004. **94(8)**: p. 1124-1132.
215. Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F, Soldani G, *Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice*. Acta Biomater, 2013. **9(8)**: p. 7814-7821.
216. Losi P, Briganti E, Magera A, Spiller D, Ristori C, Battolla B, Balderi M, Kull S, Balbarini A, Di Stefano R, Soldani G, *Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane-fibrin composite scaffolds for controlled delivery of pro-angiogenic growth factors*. Biomaterials, 2010. **31 (20)**: p. 5336-5344.
217. Sacchi V, Mittermayr R, Hartinger J, Martino MM, Lorentz KM, Wolbank S, Hofmann A, Largo RA, Marschall JS, Groppa E, Gianni-Barrera R, Ehrbar M, Hubbell JA, Redl H, Banfi A, *Long-lasting fibrin matrices ensure stable and functional angiogenesis by highly tunable, sustained delivery of recombinant VEGF164*.
218. Arkudas A, Tjiawi J, Saumweber A, Beier JP, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U, *Evaluation of blood vessel ingrowth in fibrin gel subject to*

- type and concentration of growth factors*. J. Cell. Mol. Med., 2008. **13(9)**: p. 2864-2874.
219. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP, *Fibrin structure and wound healing*. J Thromb Haemost, 2006. **4**: p. 932-939.