

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Endotheliale und mesenchymale Kokultivierung auf Kalziumkarbonatmatrizes**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Petra Julia Anna Melsheimer**

aus

Frechen

Göttingen 2023

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent*in:	PD Dr. med. Dr. med. dent. F. Böhrnsen
Ko-Referent*in:	Prof. Dr. Arndt Schilling
Drittreferent*in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 26.07.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Endotheliale und mesenchymale Kokultivierung auf Kalziumkarbonatmatrizes“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Böhrnsen F, **Melsheimer P**, Natorp M, Rolf H, Schminke B, Kauffmann P, Wolfer S, Schliephake H (2021): Cotransplantation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells on calcium carbonate and hydroxylapatite scaffolds in vivo. *J Craniomaxillofac Surg* 49, 238–245

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Osteogenese und Angiogenese.....	1
1.2 Knochenregeneration .....	1
1.3 Gewünschte Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien .....	3
1.3.1 Biokompatibilität .....	3
1.3.2 Osteoinduktion .....	3
1.3.3 Osteokonduktion.....	3
1.3.4 Osteogene Eigenschaften.....	4
1.4 Arten von Knochenersatzmaterialien .....	4
1.4.1 Autogene Ersatzmaterialien.....	4
1.4.2 Allogene Ersatzmaterialien .....	4
1.4.3 Alloplastische Ersatzmaterialien .....	4
1.4.4 Xenogene Ersatzmaterialien .....	4
1.5 Verwendung von Calciumcarbonat als Gerüstmaterial.....	5
1.6 Osteogenen Vorläuferzellen .....	6
1.7 Angiogene Zellen im Tissue Engineering.....	6
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1 Geräte und Materialien.....	10
2.2 Zellmedien und Zellen.....	12
2.3 Zellkultur von MSC und HUVEC.....	13
2.3.1 Kultivierung der Zellen .....	13
2.3.2 Passagieren der Zellen .....	13
2.3.3 Kryokonservierung der Zellen .....	14
2.4 Vorbehandlung der Träger.....	14
2.5 Färbung mit PKH .....	15
2.6 qRT-PCR-Analysen.....	16
2.6.1 Durchführung der qRT-PCR.....	18
2.7 Versuchsablauf in vitro und in vivo .....	19
2.7.1 Besiedlung der Träger mit Zellen .....	19
2.7.2 In-vitro-Kontrollanalysen .....	20
2.7.3 In-vivo-Implantation.....	20
2.8 Einbetten der Proben in Technovit und Zuschneiden der Träger.....	22
2.9 Entplastung und Färbung der Träger mit Smith Karagianes .....	22
2.10 Darstellung humaner Zellen mittels In-situ-Hybridisierung .....	22
2.11 Immunhistochemischer Nachweis mittels Osteopontin.....	24

2.12	Statistische Auswertung.....	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1	In-vitro-Vitalfärbung mit PKH 26 und 67 .....	26
3.2	In-vivo-Vitalfärbung mit PKH 26 und 67.....	26
3.3	Expression von osteogenen und angiogenen Faktoren .....	28
3.3.1	CD31, VEGF und vWF .....	28
3.3.2	OPG, Runx2 und Osteonectin.....	28
3.4	CISH zur Detektierung humaner Zellen .....	29
3.5	Neovaskularisierung auf in vivo präkultivierten Matrizes.....	30
3.6	Mineralisation auf in vivo präkultivierten Matrizes.....	31
3.6.1	Smith Karagianes.....	31
3.6.2	Osteopontinexpression auf in vivo präkultivierten Matrizes .....	32
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>34</b>
4.1	In-vivo-Nachweis von MSC und HUVEC mit Hilfe von CISH.....	34
4.2	Zelluläre Präkultivierung resultiert in einer Veränderung der Angiogenese .....	34
4.3	Zelluläre Präkultivierung resultiert in einer Veränderung der Mineralisation.....	36
4.4	Ausblick.....	37
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>40</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MSC in Kultur.....	6
Abbildung 2: HUVEC in Kultur.....	7
Abbildung 3: MSC und HUVEC in Kokultur.....	8
Abbildung 4: Kalziumkarbonatträger genormt zugeschnitten .....	15
Abbildung 5: MSC in Kultur (gefärbt mit PKH 26); HUVEC in Kultur (gefärbt mit PKH 67) .....	15
Abbildung 6: Versuchsablauf.....	20
Abbildung 7: Ratte mit Positionierung der Träger.....	21
Abbildung 8: Schema der In-situ-Hybridisierung.....	24
Abbildung 9: Kalziumkarbonatträger mit MSC und HUVEC besiedelt (in vitro) .....	26
Abbildung 10: Kalziumkarbonatträger mit MSC und HUVEC nach Explantation aus Ratte...27	
Abbildung 11: Expression von CD31, VEGF und vWF.....	28
Abbildung 12: Expression von OPG, Runx2 und Osteonectin .....	29
Abbildung 13: Anzahl der in situ positiven Zellen nach 14 Tagen .....	30
Abbildung 14: Anzahl der in situ positiven Zellen nach 28 Tagen .....	30
Abbildung 15: Gefäßanzahl auf Kalziumkarbonatträgern nach 14 Tagen.....	31
Abbildung 16: Gefäßanzahl auf Kalziumkarbonatträgern nach 28 Tagen.....	31
Abbildung 17: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat nach 14 Tagen (Smith Karagianes).....	32
Abbildung 18: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat nach 28 Tagen (Smith Karagianes).....	32
Abbildung 19: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat nach 14 Tagen (Osteopontin) ...33	
Abbildung 20: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat nach 28 Tagen (Osteopontin) ...33	

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl knöcherner Ersatzmaterialien und deren Wirkungsweise .....	5
Tabelle 2: Geräte.....	10
Tabelle 3: Computerprogramme .....	11
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien .....	11
Tabelle 5: Trägermaterial .....	11
Tabelle 6: Kits und Sonden.....	12
Tabelle 7: Zellmedien.....	12
Tabelle 8: Zellen.....	13
Tabelle 9: Ansatz für PKH-Färbungen.....	16
Tabelle 10: Auswahl der verwendeten Primer .....	17
Tabelle 11: Ansatz je Probe zur Reversen Transkription.....	18
Tabelle 12: Ansatz je Well für die qRT-PCR .....	19
Tabelle 13: Zellanzahl auf Trägern .....	19



## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein-2</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD 31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CISH	Chromogene in-situ-Hybridisierung
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
EBM-2	<i>Endothelial cell basal medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	<i>Endothelial cell growth medium</i>
F	<i>Forward</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
MEA	2-Methoxyethylacetat
MSC	<i>Mesenchymal stroma cells</i>
MSCBM	<i>Mesenchymal stem cell basal medium</i>
MSCGM	<i>Mesenchymal stem cell growth medium</i>
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	<i>Quantitative real time-polymerase chain reaction</i>
R	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNU-Ratten	Rowett Nude-Ratten
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cystein</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	Von Willebrand Faktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Osteogenese und Angiogenese

Der physiologische Knochenhaushalt unterliegt einem stetigen Wechselspiel zwischen Knochenbildung und -abbau. Für die Bildung der Knochenmatrix sind die Osteoblasten zuständig, die Knochenresorption jedoch übernehmen die Osteoklasten (Zaidi 2007). Dysbalancen in diesem sonst im Gleichgewicht stehenden Wechselspiel können in skelettale Erkrankungen, wie z. B. in Osteoporose, Arthritis oder Osteolysen, münden (Hill 1998). Letztere können u. a. durch Entzündungen oder Karzinome ausgelöst werden und führen oft zu großen knöchernen Defekten. Die Versorgung dieser Defekte stellt Ärzte immer wieder vor Herausforderungen (Shanbhag et al. 2016). Um Lösungen für dieses medizinische Problem entwickeln zu können, ist es wichtig, zunächst die physiologische Knochenneubildung zu betrachten. (Campbell und Kaplan 1992; Dennis et al. 2015).

Als chondrale Ossifikation bezeichnet man die Knochengewebsbildung aus Knorpelgewebe (Scotti et al. 2013). Chondrozyten bilden zunächst ein Knorpelgerüst am Ort der späteren Knochenentstehung. Daraufhin wandern Osteoblasten, Osteoklasten und hämatopoetische Zellen sowie Endothelzellen für die Blutgefäßbildung ein und wandeln das zuvor gebildete Knorpelgerüst zu Knochen um (Berendsen und Olsen 2015). Chondrale Ossifikation findet in der Schädelbasis, im Hinterhaupt, im Achsenskelett sowie im Extremitätenskelett statt (Berendsen und Olsen 2015). Im Rahmen der desmalen Osteogenese wird ohne chondralen Zwischenschritt direkt Knochen aus Bindegewebe hergestellt (Yang et al. 2012). Im Verlauf der Knochenbildung sammeln sich Mesenchymzellen, die zu Osteoblasten differenzieren (Runyan und Gabrick 2017). Das Schädeldach, der Gesichtsschädel und die Clavicula entstehen durch diese Form der desmalen Ossifikation (Berendsen und Olsen 2015). Der für die chondrale als auch desmale Ossifikation relevanteste Faktor ist die Angiogenese (Percival und Richtsmeier 2013; Dennis et al. 2015). Im Rahmen der Angiogenese dient das bestehende Gefäßsystem als Basis für den Ausbau und die Entwicklung weiterer Gefäßsysteme (Noden 1989). Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass die embryonale Form der Vasculogenese auch nach Abschluss des eigentlichen embryonalen Wachstums weiterhin stattfinden kann (Ratajska et al. 2017). Ursächlich hierfür können z. B. hypoxische Reize sein (Tamanini und Ambrogi 2004; Tabata et al. 2019). Ebenso durchdringen im Zuge der Gewebeheilung angiogene Kapillaren das Fibrinnetz und bilden mikrovaskuläre Netzwerke (Tonnesen et al. 2000; Dennis et al. 2015; Augustin 2016).

## 1.2 Knochenregeneration

Das Knochengewebe stellt eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar. Schon seit den frühen Anfängen der Medizin sahen sich Ärzte aufgrund von Tumoren oder Kriegs-

verletzungen ihrer Patienten mit der Problematik konfrontiert, fehlende oder defekte Knochen im Körper therapieren zu müssen. So wurde bereits im Jahr 1668 durch den niederländischen Chirurg van Meekeren die erste wissenschaftlich dokumentierte Knochentransplantation am Schädel eines Soldaten durchgeführt (Sanan und Haines 1997; Ferreira et al. 2014; Liang et al. 2018). Knochendefekte setzen die Lebensqualität der erkrankten Personen durch Schmerzen, Arbeitslosigkeit und Bewegungseinschränkungen stark herab (Woolf und Pflieger 2003). Zudem rufen sie, aufgrund kostspieliger Behandlungsmaßnahmen, hohe Ausgaben im Gesundheitswesen hervor (De Witte et al. 2018). Um diese Problematik zu lösen, ist die Therapie von Knochendefekten Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung. Knochenersatzmaterialien werden heute in mehreren chirurgischen Gebieten benötigt, so z. B. in der Neurochirurgie, Orthopädie, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und in der chirurgischen Zahnmedizin (Jordana et al. 2017).

Zur Wahl stehen autologe (Spender und Empfänger sind ein Individuum), allogene (Spender und Empfänger gehören zu einer Spezies) und xenogene (Spender und Empfänger gehören zu verschiedenen Spezies) Materialien (García et al. 2014; Amoian et al. 2016; Fillingham und Jacobs 2016). Ebenso gibt es synthetisch hergestellte, alloplastische Substanzen, wie z. B. Trikalziumphosphate (Campana et al. 2014). Die Versorgung von knöchernen Defekten mit autologen Knochentransplantaten gestaltet sich in vielen Fällen schwierig, dennoch stellen diese den Goldstandard in der chirurgischen Therapie dar (García-Gareta et al. 2015). Der Spender des Transplantates leidet jedoch nach der Entnahme unter Umständen an starken Schmerzen und physiologischen Einschränkungen in diesem Areal (Burg et al. 2000; Walsh et al. 2017). Um eine optimale Einheilung zu gewährleisten, ist eine rasche vaskuläre Kreislaufanbindung notwendig, zumal die Ernährung des Transplantates über Diffusion ab einer Größe von ca. 2- 2,5 cm<sup>3</sup> nicht mehr in einem ausreichenden Maße möglich ist (Seebach et al. 2012; Nauth et al. 2018). Resorptionen, Abstoßungen oder Nekrosen sind dann oftmals die Folgen. Defekte dieser Größe werden als Critical Size Defect bezeichnet (Schemitsch 2017; Nauth et al. 2018). Um diese komplexen Defekte dennoch versorgen zu können, bedient man sich heute der Mikrogefäßchirurgie. So können größere Transplantate mit eigener vaskulärer Struktur versorgt werden (Sanders und Mayou 1979). Bei der Anwendung dieser Therapie werden Blutgefäßanastomosen zwischen dem Empfängergewebe und dem autologen Knochentransplantat geschaffen (Sparks et al. 2018). Das größte Risiko dieser Behandlungsmethode ist das Versagen der Gefäßanastomosen. Dies mündet, wenn unbemerkt, in einen nekrotischen Verlust des oftmals ausgedehnten Transplantates (van Gemert et al. 2018).

Mit Hilfe des Tissue Engineerings wurden Versuche seit den 1990er Jahren begonnen, diese Nachteile zu umgehen, indem alloplastische und xenogene Gewebetransplantate entwickelt wurden (Langer und Vacanti 1993; Yousefi et al. 2015). Tissue Engineering wird beschrieben als die Übertragung wissenschaftlicher Grundsätze von lebenden Geweben und deren

Wachstum, Konstruktion und Modifikation auf Biomaterialien, Zellen und Wachstumsfaktoren (Keane und Badylak 2014; Coury 2016). Beim knöchernen Tissue Engineering im Besonderen wird versucht, folgende Ansätze zu optimieren:

- die Verwendung von osteogenen und endothelialen Vorläuferzellen, sowie von Wachstumsfaktoren (z. B. BMP-2, Bone morphogenetic protein-2)
- die Verwendung von Gerüstmaterialien, die ähnliche biomechanische Eigenschaften besitzen wie das zu ersetzende Gewebe (Hollister et al. 2002)

Aktuell folgt knöchernes Tissue Engineering der Idee, xenogene oder allogene Trägermaterialien zu verwenden, die mit knocheninduzierenden Vorläuferzellen besiedelt werden können (Khan et al. 2012). Diese das Knochenwachstum anregenden Vorläuferzellen können z. B. aus einem mesenchymalen Stammzellenpool wie dem Knochenmark gewonnen werden (Fillingham und Jacobs 2016).

### **1.3 Gewünschte Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien**

Die Trägermaterialien, die helfen, das Knochengewebe zu regenerieren, sollen einen Kompromiss aus Porosität und Festigkeit aufweisen (Hutmacher 2001). Eine dreidimensionale, poröse Struktur bietet eine Leitstruktur für Zellattachement, Proliferation und Differenzierung. Eine mikroporige Oberfläche bietet eine das Knochenwachstum anregende Umgebung (Habibovic et al. 2006). Ebenso müssen die Gerüste eine Stabilität aufweisen, um den unterschiedlichen Biege- und Zugkräften im Knochenlager standzuhalten (Butler et al. 2000). Folgende gewünschte Eigenschaften wurden für Knochenersatzmaterialien beschrieben (Dias et al. 2017):

#### **1.3.1 Biokompatibilität**

Das Material soll keine Abstoßungsreaktionen zeigen (Sergeeva et al. 2014), bzw. mit einer angemessenen Wirtsreaktion interagieren (Mertz 2013). Eine biokompatible Substanz ermöglicht eine gute Wundheilung (Ratner 2011) und zeigt keine toxikologischen Eigenschaften (Mertz 2013).

#### **1.3.2 Osteoinduktion**

Im Rahmen einer Osteoinduktion erfolgt die Differenzierung von Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten. Hierzu werden unter anderem mesenchymale, undifferenzierte Stammzellen rekrutiert, die zur Neubildung und Umwandlung von Knochen beitragen (Albrektsson und Johansson 2001).

#### **1.3.3 Osteokonduktion**

Ein osteokonduktives Material dient als Leitschiene für die Bildung neuen Knochens. Kapillaren, Weichgewebe und Osteoprogenitorzellen wandern in die Poren ein und infiltrieren

den Träger (Dias et al. 2017). Der Träger wird schließlich vom Empfängergewebe durchdrungen und wächst in den Knochen ein (Cornell 1999).

### **1.3.4 Osteogene Eigenschaften**

Osteogene Materialien haben die Eigenschaft, eine Osteogenese zu induzieren (Ren et al. 2021). Eine Knochenneubildung innerhalb eines Transplantates wird durch die Differenzierung und den Stoffwechsel osteogener Vorläuferzellen und Osteoblasten hervorgerufen (Pape et al. 2010).

## **1.4 Arten von Knochenersatzmaterialien**

### **1.4.1 Autogene Ersatzmaterialien**

Sind der Spender und der Empfänger des Transplantates ein Individuum, spricht man von autogenen Ersatzmaterialien. Diese dienen als Maßstab für alle Knochenersatzmaterialien, da sie aufgrund osteokonduktiver, osteoinduktiver und osteogener Eigenschaften besonders biokompatibel sind (Fillingham und Jacobs 2016) (siehe Tabelle 1).

### **1.4.2 Allogene Ersatzmaterialien**

Dient ein Individuum derselben Spezies, also ein anderer Mensch, als Spender, spricht man von allogenen Ersatzmaterialien (Garcia et al. 2014). Dabei handelt es sich um gereinigten und aufbereiteten Knochen von lebenden oder verstorbenen Spendern (Campana et al. 2014).

### **1.4.3 Alloplastische Ersatzmaterialien**

Alloplastische Ersatzmaterialien werden synthetisch hergestellt und haben keinen natürlichen Ursprung. Es besteht eine große Auswahl an alloplastischen Materialien. Zu ihnen zählen Keramiken, Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Kalziumphosphatzemente, Kalzi-umsulfat, Polymere und Komposite (Campana et al. 2014).

### **1.4.4 Xenogene Ersatzmaterialien**

Bei dieser Art des Ersatzmaterials dienen andere Spezies als Spender. In Frage kommende Tiere sind unter anderem Rinder, Schweine oder auch Korallen (Campana et al. 2014). Das Material muss vor der Verwendung aufgearbeitet und sterilisiert werden (Garcia et al. 2014). Durch die chemische und physikalische Behandlung soll beim Empfänger eine antigene Reaktion oder die Übertragung von Zoonosen vermieden werden (Amoian et al. 2016).

Tabelle 1: Auswahl knöcherner Ersatzmaterialien und deren Wirkungsweise

	<b>Autogen</b>	<b>Allogen</b>	<b>Alloplastisch</b>	<b>Xenogen</b>
Osteokonduktiv	x	x	x	x
Osteoinduktiv	x	x		
Osteogen	x			

## 1.5 Verwendung von Calciumcarbonat als Gerüstmaterial

Maritime Materialien werden zur Verwendung als Gewebeersatz erforscht (Demers et al. 2002; Green et al. 2014). So Biocoral® (von den Französischen Antillen), welches aus dem Exoskelett der Weißkoralle gewonnen wird und aus Kalziumcarbonat besteht (Soost 1996; Yukna und Yukna 1998). In seinem chemischen und morphologischen Aufbau ist es der Spongiosa des menschlichen Knochens nahezu analog (Soost 1996; Demers et al. 2002). Ersatzmaterialien aus Koralle besitzen eine biokompatible Oberfläche, auf der sich Knochen- und Gefäßzellen anheften, vermehren und differenzieren können (Demers et al. 2002). Zudem haben sie eine osteokonduktive Wirkungsweise, denn das porige Gerüst bietet menschlichen Blutgefäßen und Knochenzellen die Möglichkeit, entlang dieser Leitstruktur einzuwachsen (Demers et al. 2002; Green et al. 2014). Ebenso bietet es durch seine Formstabilität eine ideale Gerüststruktur, um den mechanischen Belastungen im Knochen Stand zu halten. Biocoral® weist somit mit seiner dreidimensionalen Struktur und seiner rauen Oberfläche gute Möglichkeiten zur Angiogenese und Knochenneubildung auf und ist ein optimales xenogenes Knochenersatzmaterial (Soost 1996; Soost et al. 1998; Koëter et al. 2009; Giuliani et al. 2014; Pountos und Giannoudis 2016). Im Gegensatz zu anderen xenogenen Knochenersatzmaterialien, z. B. aus Rinderknochen, besteht kein Restrisiko einer Zoonose (z. B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit). In vorherigen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass sich osteogene und angiogene Vorläuferzellen, die auf Träger aus Kalziumkarbonat aufgebracht wurden, vermehren und differenzieren (Liu et al. 2015; Böhrnsen und Schliephake 2016). Wird die Oberfläche der Träger zusätzlich mit Fibronectin beschichtet, wird eine höhere Zellansiedlungszahl nachgewiesen (in vivo) (Zhu et al. 2010). Wenn mit Hilfe einer, mit regenerativen Zellen vorbesiedelten, Matrix Zellen an den Rand eines Defektes im Gewebe (z. B. Knochen) gebracht werden, können diese die Geweberneuerung unterstützen (Kramer et al. 2006). In Verbindung mit osteogenen Vorläuferzellen konnte somit eine Knochenneubildung in knöchernen Defekten mit Hilfe von Biocoral® beobachtet werden (Petite et al. 2000; Liu et al. 2017).

## 1.6 Osteogenen Vorläuferzellen

Aus dem humanen, erwachsenen Knochenmark gehen multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) hervor, die in der späteren Differenzierung in Fett-, Knochen-, Knorpel-, Muskel- und Bindegewebe zu finden sind (Pittenger et al. 1999; Campana et al. 2014) (siehe Abbildung 1). Multipotente mesenchymale Stromazellen, die zu knochenbildenden Zellen werden sollen, entwickeln sich über Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten und Osteoblasten zu Osteozyten (Komori 2018). Es konnte gezeigt werden, dass MSC einfach zu gewinnen sind, so z. B. aus Fettgewebe und zur osteogenen Differenzierung gebracht werden können (Zuk et al. 2001; Alhadlaq und Mao 2004; Böhrnsen et al. 2009; Böhrnsen et al. 2012). Man nimmt an, dass an Stellen im knöchernen Gewebe, an dem Osteoklasten tätig sind, Faktoren ausgeschüttet werden, die die Migration von mesenchymalen Stromazellen hervorrufen (Tang et al. 2009). Diese multipotenten mesenchymalen Stromazellen können sich dann z. B. zu knochen-, knorpel- oder muskelbildenden Zellen umformen (Caplan 2017). MSC bilden einen möglichen Pool für Osteoprogenitorzellen, und somit können zeitlebens im menschlichen Organismus mittels Wachstumsfaktoren (z. B. BMP-2, RunX2 (Runt-related transcription factor 2)) und Hormonen neue Osteozyten gebildet werden (Komori 2018; Bayat et al. 2019). Ein großer Vorteil der mesenchymalen Stromazellen ist ihre einfache Isolation aus Geweben, ihr gutes Wachstum unter Laborbedingungen und ihr hohes Potential zur Regeneration und Plastizität (Campana et al. 2014).

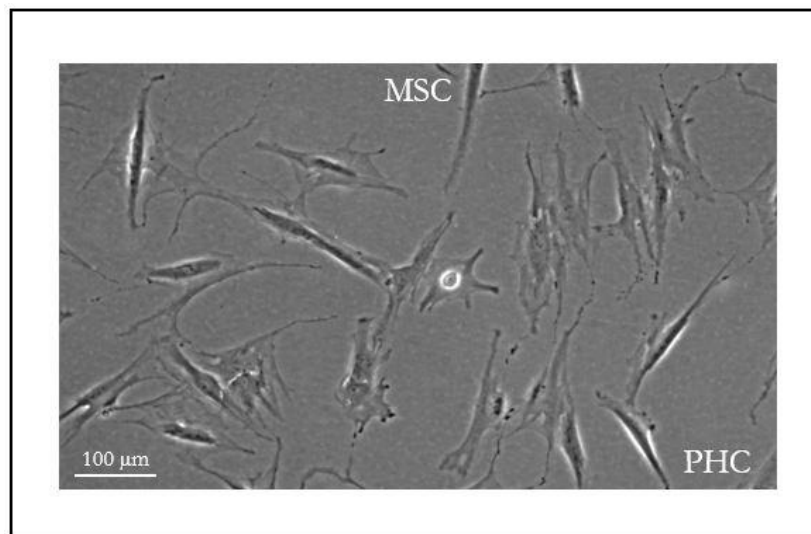


Abbildung 1: MSC in Kultur, Passage 4, Knochenmarksaspirat, Phasenkontrastmikroskopie

## 1.7 Angiogene Zellen im Tissue Engineering

Endothelzellen bzw. endotheliale Progenitorzellen sind in anderen Geweben, wie der Nabelschnur (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), dem peripheren Blut, Knochenmark und der fetalen Leber zu finden (Quirici et al. 2001; Hristov et al. 2003; Ribatti 2004). Endothelzellen haben ein polygonales Aussehen (Jaffe et al. 1973), dienen in Blutgefäßen der

Abschirmung zwischen Blutzellen und Gewebe und verhindern somit ungewollte, thrombotische und inflammatorische Ereignisse im Körper (Cheung 2007). In einem statischen Medium, wie z. B. in der Zellkultur, weisen die Zellen ein polygonales Aussehen auf, in vivo sind Endothelzellen spindelförmig und richten sich stromlinienförmig nach dem Blutfluss aus (Langille und Adamson 1981) (siehe Abbildung 2). Sie kleiden einschichtig alle menschlichen Gefäßwände aus und sind maßgeblich an der Regulierung der Hämostase (Rajendran et al. 2013) und Reaktionen des Immunsystems (Santiago-Delpin 2004) beteiligt.

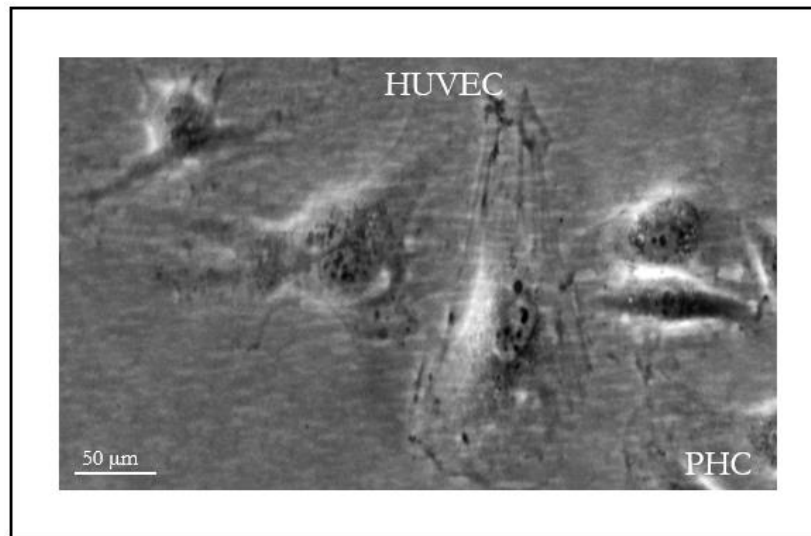


Abbildung 2: HUVEC in Kultur, Passage 4, Phasenkontrastmikroskopie

Im äußeren Bereich eines Transplantates werden Zellen durch Diffusion versorgt, im Inneren kommt es ab einer gewissen Transplantatgröße aufgrund von Hypoxie und Unterversorgung mit Nährstoffen zum Untergang der zellulären Strukturen (Barabaschi et al. 2015). In einem vaskularisierten Transplantat bilden Endothelzellen ein Netzwerk aus Gefäßen, welches sich nach der Transplantation mit den Gefäßen des umliegenden Gewebes verbinden kann (Tsigkou et al. 2010). Interessanterweise zeigen Kokulturen von HUVEC und MSC sowohl ein angiogenes, als auch ein osteogenes Potential auf (Böhrnsen und Schliephake 2016) (siehe Abbildung 3). Diese knochen- und gefäßinduzierenden Eigenschaften prädestinieren beide Zellarten für die Verwendung auf vorbesiedelten Gerüststrukturen, um Knochendefekte aufzufüllen (Deng et al. 2017; Liu et al. 2017; Zhang S et al. 2017).



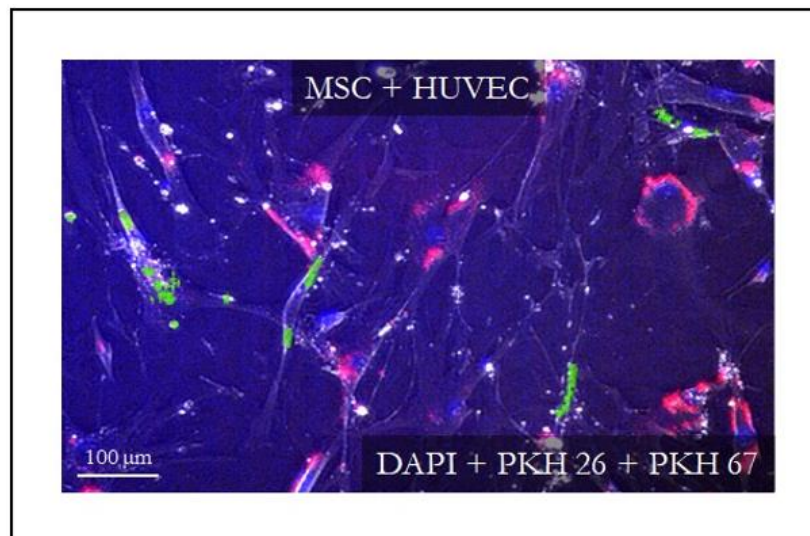


Abbildung 3: MSC (PKH 26, rot und DAPI) und HUVEC (PKH 67, grün und DAPI) in Kokultur, Fluoreszenzmikroskopie

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Autologe Transplantate gelten auch nach Jahrzehnten der intensiven Forschung bei der Behandlung größerer Knochendefekte (critical size defects) als Goldstandard. Das Leiden von Patienten nach einer Transplantatentnahme und auch die Kosten für das Gesundheitswesen sind jedoch nicht zu vernachlässigen (Langer und Vacanti 1993), weswegen Lösungen gesucht werden, um diese Probleme zu umgehen. In aktuellen Forschungsansätzen werden alloplastische und xenogene Gerüststrukturen *in vitro* untersucht, die mit MSC und HUVEC vorbesiedelt werden. Diese Vorbesiedlung mit Stammzellen soll zu einer besseren Prävascularisierung in den Trägern führen und im weiteren Verlauf eine Osteogenese begünstigen, wodurch sie optimale Knochenersatzmaterialien darstellen würden. In zahlreichen Arbeiten konnten Erfolge *in vitro* mit prävascularisierten Gerüststrukturen gezeigt werden (Liu et al. 2013; Fu et al. 2014; Barabaschi et al. 2015; Liu et al. 2015; Roux et al. 2015; Böhrnsen und Schliephake 2016; Holmes et al. 2016). Da die Übertragung dieser Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen auf den menschlichen Organismus nur eingeschränkt möglich ist, ist es unerlässlich, diese zellulären Abläufe *in vivo* zu untersuchen, um zukünftig geeignete Therapiemaßnahmen für Patienten ableiten zu können. Die Zielsetzung in dieser Arbeit war somit die Untersuchung der angiogenen und osteogenen Entwicklungen von mit Zellen vorbesiedelten xenogenen Gerüststrukturen *in vivo*. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob eine gleichzeitige Besiedlung der Träger mit mesenchymalen und endothelialen Zellen eine gesteigerte Neubildung von Gefäßen und Mineralisation *in vivo* hervorbringt. Vor der Implantation wurde die erfolgreiche zelluläre Konditionierung der Träger mit MSC und HUVEC mittels PKH-Färbung und qRT-PCR (Quantitative real time-polymerase chain reaction) geprüft. Untersucht wurden angiogene Marker wie vWF (Von Willebrand Faktor), CD31 (Cluster of differentiation 31) und VEGF (Vascular endothelial growth factor), sowie osteogene Marker

---

(Osteoprotegerin, Osteonectin, Runx2). Die vorbesiedelten Träger aus Biocoral® wurden für 14 und 28 Tage in atymischen Ratten belassen und nach der Explantation analysiert. Betrachtet wurden Gefäßneubildung und Mineralisation auf den Trägern mit Hilfe der Färbungen nach Smith Karagianes und Osteopontin. Zudem wurde die Beständigkeit menschlicher Zellen im xenogenen Organismus (Ratte) durch die In-situ-Hybridisierung und PKH-Färbung gezeigt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Bioclav	Schütt-Biotech, Göttingen
Diamantbandsäge	EXAKT, Norderstedt
Drucktopf	Leybold, Hürth
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrische Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim
Gefrierschrank -80 °C	GFL, Burgwedel
Handstück, elektrisch mit Mikromotor	KaVo Dental, Biberach
Kühlschrank 4 °C bis -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Lasermikroskop konfokal scannend FV 1000	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroliterpipetten Eppendorf Reference (10-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling
Mikroskop AxioVert 200M	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop AxioVert 35	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Keyence BZ-X 800	Keyence, Neu-Isenburg
PCR Real-Time-Thermocycler MyIQ	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
PCR Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Trenndünnschliffgerät	EXAKT, Norderstedt
Trennscheibe für Handstück, Komet Dental	Gebrüder Brassler, Lemgo
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Vortex-Genie® 2 2 Shaker	Cole-Parmer, Wertheim am Rhein
Wasserbad WB10	Memmert, Schwabach
Zellkultur Inkubator CO <sub>2</sub> -Incubator	Sanyo, Moriguchi, Japan
Zellkultur Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkultur Werkbank EN 12469	Clean Air Systems, Chennai, Indien
Zellzählung CASY®-System Casy 1 Modell TT	Roche, Basel, Schweiz
Zentrifuge Eppendorf Mini Spin 5424	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sigma 2K15C	Sigma Laborzentrifugen, Osterode im Harz

Tabelle 3: Computerprogramme

Programm	Hersteller
Programm AxioVision 4.9	Carl Zeiss, Oberkochen
Programm GraphPad PRISM	GraphPad Software, Madrid, Spanien
Programm ImageJ	NIH, Bethesda, USA
Programm iQ5 Optical System Software	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
Programm VisionEditor	Keyence, Neu-Isenburg
Programm Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Programm Microsoft Word	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
iQ 96-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
Latexhandschuhe Gentle Skin sensitive	Rösner-Mautby Meditrade, Kiefersfelden
Objekträger Glas	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
PCR Kunststoffolie	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur 96-Well-Kulturplatte mit Deckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Eppendorf-Cup 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Falcon (15, 50 ml)	BD, Franklin Lakes, USA
Zellkultur Gewebekulturflaschen (25-175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Gewebekulturschale (Ø 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Kryoröhrchen (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzählung CASY® Probenbecher	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 5: Trägermaterial

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Biocoral, Disk diam., 5mm x 3 mm	Ref.: PRD079, LOT: 1612DT1103	Biocoral France, La Garenne Colom- bes, Frankreich

Tabelle 6: Kits und Sonden

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
iScript™ cDNA Synthese Kit	LOT: 1708891	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
iQ® SYBR Green Supermix Kit	LOT: 1708880	Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spanien
RNeasy Mini Kit	LOT: 130175434	Quiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
ZytoFast Plus CISH Implementation Kit HRP- DAB	LOT: N56-922088951	ZytoVision, Bremerhaven
ZytoFast-CISH-Sonde, Digoxigenin- markiert	LOT: T-1053-400/ T- 1054-400	ZytoVision, Bremerhaven

## 2.2 Zellmedien und Zellen

Tabelle 7: Zellmedien

Medium	Bestandteile	Menge	Beschreibung	Hersteller
EBM™-2 Basal Medium, Poietics		500 ml	LOT: 0000442169	Lonza, Walkers- ville, USA
EGM™-2 Single- Quots™ Kit, Poi- etics	FBS Hydrocortison hFGF-B VEGF R3-IGF-1 Ascorbinsäure hEGF GA-1000 Heparin	10 ml 0,2 ml 2 ml 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml	LOT: 0000449858	Lonza, Walkers- ville, USA
MSCBM Basal Medium, Poietics		440 ml	LOT: 0000435603	Lonza, Walkers- ville, USA
MSCGM™ Sin- gleQuots™, Poi- etics	L-Glutamin GA-1000 MCGS (mesen- chymal cell growth supplement)	10 ml 0,5 ml 50 ml	LOT: 0000413641	Lonza, Walkers- ville, USA

Tabelle 8: Zellen

Zellen	Beschreibung	Hersteller
hMSC, Poietics	PT-2501, Donor 28308, LOT: 0000446319	Lonza, Walkersville, USA
HUVEC, Poietics	C 2517A, Donor 28132, LOT: 0000439577	Lonza, Walkersville, USA

## 2.3 Zellkultur von MSC und HUVEC

### 2.3.1 Kultivierung der Zellen

Für das Versuchsvorhaben wurden MSC und HUVEC der Firma Lonza verwendet (siehe Tabelle 8). Während des Versuchsvorhabens wurden sterile Materialien und Lösungen gebraucht, sowie in der Zellkultur unter sterilen Werkbänken gearbeitet (siehe Tabelle 2 und Tabelle 4). Die Kultivierung der MSC fand entsprechend der Herstellerangaben in MSCBM Basal Medium (Mesenchymal stem cell basal medium) gemischt mit MSCGM™ SingleQuots™ (Mesenchymal stem cell growth medium) statt und die Kultivierung der HUVEC in EBM™-2 Basal Medium (Endothelial cell basal medium) gemischt mit EGM™-2 SingleQuots™ Kit (Endothelial cell growth medium) (siehe Tabelle 7). Diese Medien werden im weiteren Verlauf mit MSC-Medium und EBM-Medium bezeichnet. Die Zellen wurden vom Hersteller in einem gefrorenen Zustand geliefert. Zur Kultivierung wurden diese im Wasserbad bei 37 Grad Celsius aufgetaut. Das MSC- und das EBM-Medium wurde ebenso im Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt. Es wurden zwei Falcons (15 ml) bereitgestellt und in ein Falcon 9 ml MSC-Medium und in das andere Falcon 9 ml EBM-Medium gefüllt. In das Falcon mit dem MSC-Medium wurden die aufgetauten MSC pipettiert und in das mit dem EBM-Medium die HUVEC. Danach erfolgte die Zentrifugation der beiden Falcons bei 300 x g für 5 Minuten und die Absaugung der Überstände. Die Zellen wurden mit dem passenden Medium resuspendiert, jeweils in Zellkulturflaschen ausplattiert (75 cm<sup>2</sup>, 5000 Zellen/ cm<sup>2</sup>) und bei 37 Grad Celsius und 5 % CO<sub>2</sub> gezüchtet. In den Versuchen wurden nur Zellen bis Passage P3 und P4 verwendet. Nicht adhärente Zellen wurden beim Tauschen des Mediums, was alle 48 Stunden erfolgte, entfernt. Nach 72 Stunden bildeten sich Zellkolonien. Die MSC zeigten eine typgerechte, spindelförmige Morphologie ohne spontane Ausdifferenzierung und auch die HUVEC wiesen eine stabile Proliferation sowie ein regelgerechtes kopfsteinpflasterartiges Wachstum auf.

### 2.3.2 Passagieren der Zellen

Es wurde eine Lösung aus Trypsin (PAN-Biotech, Aidenbach) und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, PAN-Biotech, Aidenbach) hergestellt. Dafür wurden in DPBS (Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung, PAN-Biotech, Aidenbach) 0,25 % (v/v) Trypsin und

0,02 % (v/v) EDTA gemischt. Es folgte eine sterile Filtration. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80 % wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS, aufgewärmt auf 37 Grad Celsius, gewaschen. Nachdem das DPBS entfernt wurde, wurden die Zellen mit einer dünnen Schicht der oben beschriebenen Trypsin-/ EDTA-Lösung, aufgewärmt auf 37 Grad Celsius, bedeckt und für 5 Minuten (37 Grad Celsius, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Unter einem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben, und die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe vom jeweiligen Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in einen 15 ml Falcon pipettiert und bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das am Boden zurückgebliebene Zellpellet in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums gelöst und es folgte die Zählung der Zellen mit dem CASY-Zellzählgerät (siehe Tabelle 2). Anschließend wurden die Zellen weiterhin in Zellkulturflaschen gezüchtet, bzw. bei einer ausreichenden Zellanzahl für die Versuchsvorhaben vorbereitet.

### 2.3.3 Kryokonservierung der Zellen

Überschüssige Zellen wurden in Kryoröhrchen eingefroren und somit für weitere Versuche haltbar gemacht. Dafür wurden die Zellen mit der Trypsin-/ EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, mit dem CASY-Zellzählgerät gezählt und zentrifugiert (siehe oben). Nach dem Absaugen des Überstands wurden die Zellen in einer Lösung (10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gemischt mit dem jeweiligen Kulturmedium, danach steril filtriert) resuspendiert, sodass eine Konzentration von 0,5 bis 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ ml Lösung entstand. Je ein Milliliter der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde zunächst für 4 Stunden bei -80 Grad Celsius und danach bei -196 Grad Celsius in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.4 Vorbehandlung der Träger

Die Kalziumkarbonatträger (siehe Tabelle 5) wurden vom Hersteller mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Stärke von 3 mm geliefert. Diese kleinen Zylinder wurden mit Hilfe einer Trennscheibe fachgerecht auf 1 mm Stärke genormt zurechtgeschnitten (siehe Abbildung 4). Daraufhin wurden sie in einer Petrischale mit Glasdeckel mit Hilfe des Autoklaven sterilisiert (4 Stunden bei 120 Grad Celsius). Die sterilisierten Träger wurden unter der Werkbank in 96-Well-Platten umgesetzt und mit Fibronectin beschichtet. Für einen Träger wurden 1 µl Fibronectin F2006 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 59 µl PBS (Phosphate buffered saline, Merck, Darmstadt) vermischt, der Träger in diese Mischung gelegt, die Platte mit dem Deckel verschlossen und für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Danach wurde der Überschuss abgesaugt, der Träger mit PBS gespült und in PBS gelagert. Unmittelbar vor der Benetzung der Träger mit den Zellen wurde das PBS abgesaugt (die Träger dürfen nicht austrocknen). Die Träger waren somit bereit für die Zellbesiedlung.

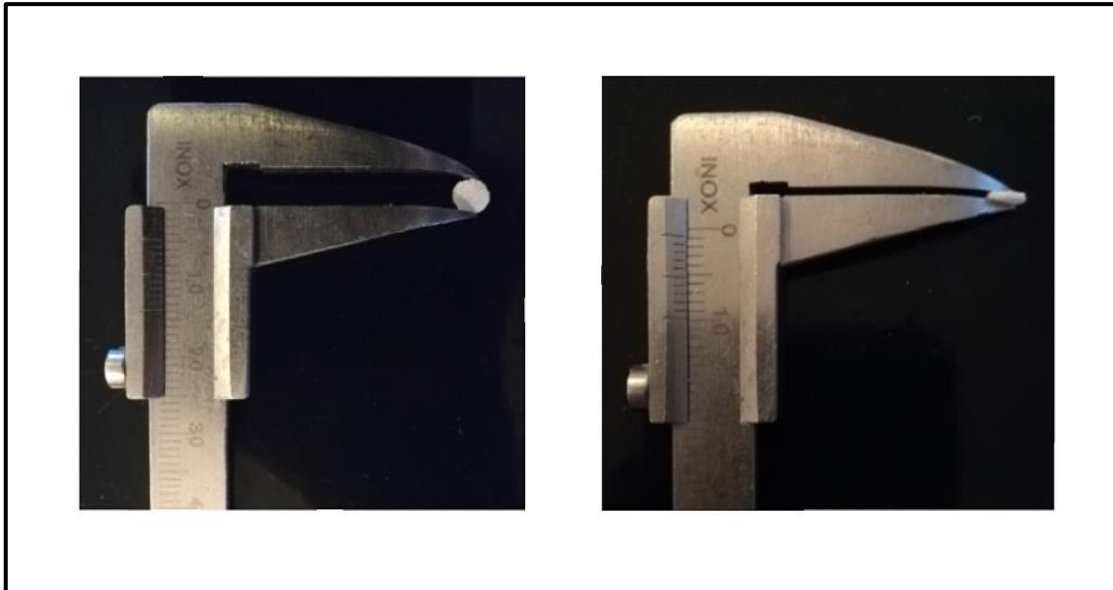


Abbildung 4: Kalziumkarbonatträger genormt zugeschnitten (5 mm Durchmesser und 1 mm Stärke)

## 2.5 Färbung mit PKH

Die PKH-Färbung bewirkt die intravitale Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Membranmarkierungen (PKH Linkern). PKH 26 leuchtet rot mit einer Erregung von 490 nm und einer Emission von 504 nm, PKH 67 leuchtet grün mit einer Erregung von 551 nm und einer Emission von 567 nm (beides SIGMA Aldrich Chemie, Taufkirchen) (Böhnsen und Schliephake 2016). Die getrennte Markierung der MSC und der HUVEC bietet die Möglichkeit der individuellen Analyse der Zellen. Die MSC wurden mit PKH 26 rot, die HUVEC wurden mit PKH 67 grün eingefärbt (siehe Abbildung 5).

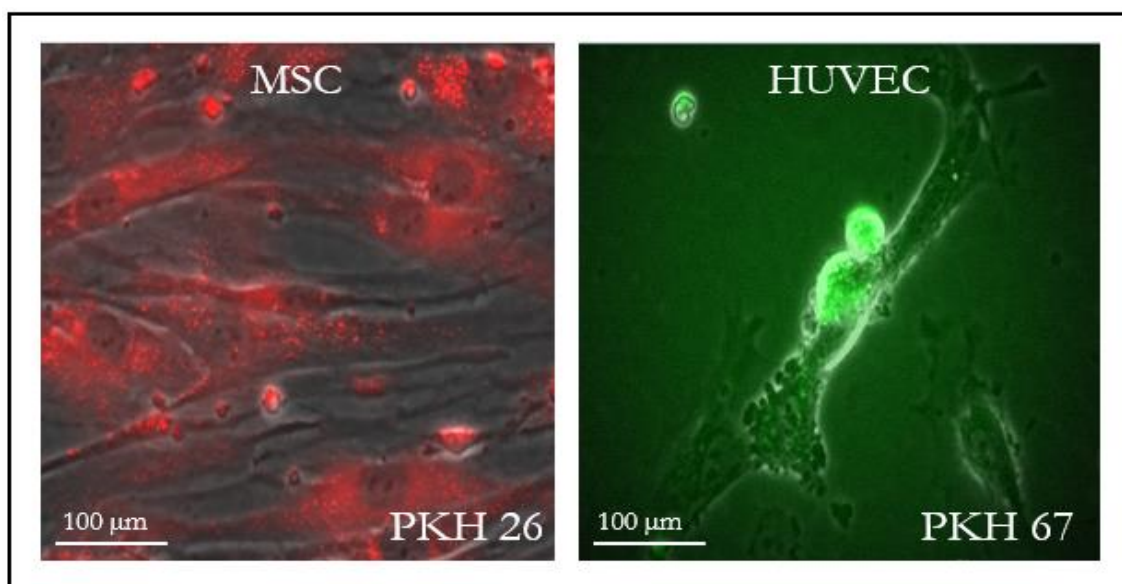


Abbildung 5: MSC in Kultur (rot gefärbt mit PKH 26); HUVEC in Kultur (grün gefärbt mit PKH 67), beides Fluoreszenzmikroskopie



Für die Färbung wurden zwei Eppendorf-Cups vorbereitet (siehe Tabelle 9, Cup A und B) (1  $\mu\text{L}$  der PKH Färbelösung ist ausreichend für bis zu einer Millionen Zellen).

Tabelle 9: Ansatz für PKH-Färbungen

Cup A für MSC [ $\mu\text{L}$ / Cup]	Cup B für HUVEC [ $\mu\text{L}$ / Cup]
249 $\mu\text{L}$ Diluent C + 1 $\mu\text{L}$ PKH 26 rot	249 $\mu\text{L}$ Diluent C + 1 $\mu\text{L}$ PKH 67 grün

Die Mischung aus Cup A wurde auf die MSC und die Mischung aus Cup B auf die HUVEC pipettiert und unter gelegentlichem Anstoßen 3 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden 500  $\mu\text{L}$  BSA (Bovines Serum Albumin, PAN-Biotech, Aidenbach) 1 % in PBS sowohl auf die MSC als auch auf die HUVEC gegeben, suspendiert und 1 Minute inkubiert. Es folgte die Zugabe und Resuspension von jeweils 1 ml EBM-Medium. Zum Waschen der Zellen wurden die Zellen bei 400 g zentrifugiert (10 Minuten), der Überstand abgesaugt und 10 ml EBM-Medium hinzugegeben. Dieser Waschvorgang wurde drei Mal durchgeführt. Sowohl das Zellpellet der HUVEC des dritten Waschvorgangs wurde in EBM-Medium resuspendiert (Suspension B) als auch das MSC-Zellpellet in EBM-Medium (Suspension A). Die zuvor mit Fibronectin beschichteten Kalziumkarbonaträger wurden 24 Stunden vor der Besiedlung mit den PKH gefärbten Zellen jeweils in eine Kammer einer 96-Well-Platte mit 200  $\mu\text{L}$  PBS gelegt. Unmittelbar vor der Besiedlung wurde das PBS abgesaugt (Träger durfte nicht austrocknen) und der Träger mit der jeweiligen Anzahl an PKH gelinkten Zellen bestückt (siehe Tabelle 13).

## 2.6 qRT-PCR-Analysen

Die genetischen Analysen der präkultivierten Träger (MSC, HUVEC, MSC + HUVEC) erfolgten 96 Stunden nach der Besiedlung mithilfe der qRT-PCR. Untersucht wurden angiogene (vWF, VEGF und CD31) und osteogene (Osteoprotegerin, Osteonectin, Runx2) Gene (siehe Tabelle 10).

Der von Willebrand Faktor nimmt Einfluss auf die Gefäßentstehung im Organismus (Randi et al. 2018) und bildet eine Verbindung zwischen der verletzten Gefäßwand, den Thrombozyten und dem Gerinnungsfaktor VIII (Echahdi et al. 2017). Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD31 wird auch PECAM-1 (Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1) genannt, ist an der Angiogenese beteiligt (DeLisser et al. 1997) und ein Marker für Endothelzellen und Gefäße (Usuda et al. 2018). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF ist ein Leitmolekül in der Angiogenese des menschlichen Körpers (Carmeliet 2005) und ein Signalmolekül, welches Perizyten und Endothelzellen im Rahmen der Prävasikularisierung aktiviert (Carmeliet und Jain 2011).

Osteoprotegerin (OPG) fördert die Entwicklung neuer Gefäße (McGonigle et al. 2009) und wirkt schützend auf den Knochen, indem es die Entwicklung von Osteoklasten hemmt (Rochette et al. 2019). Ein anderer Name für Osteoprotegerin ist TNFRSF11B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b) (Peng et al. 2018). Osteonectin/ SPARC (Secreted protein acidic and rich in cystein) ist im knöchernen Gewebe vorhanden (Ciceri et al. 2016) und wird von den Osteoblasten sezerniert (Holland et al. 1987). Es ist in großen Dosen in knöchernen Geweben mit einem hohen Stoffwechsel zu finden, so z. B. in unreifen Knochen (Rosset und Bradshaw 2016). Der Transkriptionsfaktor Runx2 ist entscheidend für das menschliche Knochenwachstum, denn bei einer Mutation des Gens für Runx2 resultiert ein Ausbleiben der Ossifikation (Iyyanar et al. 2019), zudem wird die Entwicklung von Osteoblasten im menschlichen Körper von Runx2 mit reguliert (Otto et al. 2002).

Tabelle 10: Auswahl der verwendeten Primer

Gen	Primer 5'-3'	Accession Nummer
vWF	F: 5'-GCTGCTGGACACAAGTTTGA-3' R: 5'- ACTCATGGGGCTCTGCATAC-3'	NM_014622.4
VEGF	F: 5'-CCCACTGAGGAGTCCAACAT -3' R: 5'-TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT-3'	NM_001025366.3
CD31 (PECAM 1)	F: 5'-GCTGAGTCTCACAAAGATCTAGGA-3' R: 5'- ATCTGCTTTCACGGCATCA-3'	NM_000442.5
OPG	F: 5'-CTCAGGCACTTGAGGCTTTC-3' R: 5'- TGCAAGCAGTAATAAGGGAAAA-3'	NM_002546.4
Osteonectin (hSPARC)	F: 5'-AGAGGAAACCGAAGAGGAGG-3' R: 5'-GGCAAAGAAGTGGCAGGAAG-3'	NM_003118.4
Runx2	F: 5'-TGCCTAGGCGCATTTCAGGTG-3' R: 5'-GGCTTTGGGAAGAGCCGGGG-3'	NM_001015051.3

### 2.6.1 Durchführung der qRT-PCR

Für die Isolation und Reinigung der Proben wurde das RNeasy Mini Kit (siehe Tabelle 6) nach Herstellerangaben verwendet. Zu Beginn wurden die Proben jeweils mit 350  $\mu$ l angesetzten RLT Lysepuffer (1 ml RLT Lysepuffer + 10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert, zweimal mit PBS gewaschen und die RNA (Ribonukleinsäure) isoliert. Um Kontaminationen mit DNA (Desoxyribonukleinsäure) zu beseitigen, wurden die Proben mit DNase-I versetzt, gevortext, zentrifugiert, mit 75 % Ethanol gewaschen, in 50  $\mu$ l RNA freiem Wasser resuspendiert und bei -80 Grad Celsius gelagert. Mittels einer Absorptionsmessung von 260 bis 280 nm konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA (komplementäre DNA). Um aus den RNA-Proben die dazu komplementäre cDNA herzustellen, wurde das Enzym Reverse Transkriptase zur Hilfe genommen (Bachman 2013). Zur Reversen Transkription wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (siehe Tabelle 6) nach Herstellerangaben verwendet. Für jede Probe wurde ein Mix angesetzt und es resultierte ein Volumen von 20  $\mu$ l je Probe (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Ansatz je Probe zur Reversen Transkription

Komponenten je Probe	Volumen [ $\mu$ l/Probe]
5x iScript Reaction Mix	4 $\mu$ l
iScript Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
Nuclease-freies Wasser	14 $\mu$ l
RNA-Probe	1 $\mu$ l

Proben mit 200 ng RNA-Gehalt wurden im Mastercycler (siehe Tabelle 2) transkribiert für 5 Minuten bei 25 Grad Celsius, für 30 Minuten bei 42 Grad Celsius und für 5 Minuten bei 85 Grad Celsius. Anschließend wurde die Temperatur bei 4 Grad Celsius gehalten (optional), bis die Proben weiterverarbeitet wurden. Für die qRT-PCR wurde das iQ<sup>®</sup> SYBR Green Supermix Kit (siehe Tabelle 6) und das Programm iQ5 Optical Sytem Software (siehe Tabelle 3) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden keine Störsignale bei der Untersuchung der PCR-Produkte gemessen. Die Primer vWF, VEGF, CD31, OPG, Osteonectin und Runx2 wurden untersucht (siehe Tabelle 10), sowie 96-Well-Platten benutzt und pro Well ein Mix mit 20  $\mu$ l Volumen pipettiert (siehe Tabelle 12). Jede Probe wurde als Triplet pipettiert und ausgewertet. In 2  $\mu$ l der jeweiligen Probe befanden sich 2 ng cDNA und in die Kontrollproben wurden 2  $\mu$ l RNA freies Wasser anstatt der Probe pipettiert. Nach dem Pipettieren wurden die 96-Well-Platten mit einer DNA freien Folie verschlossen, für 2 Sekunden bei 2500 rpm zentrifugiert und mit Hilfe des Real-Time-Thermocycler MyIQ (siehe Tabelle 2) ausgewertet. Die qRT-PCR begann mit der Denaturation bei 98 Grad Celsius (30 Sekunden), gefolgt von einer weiteren Denaturation bei 94 Grad Celsius (1 Sekunde), dem Annealing bei

60 Grad Celsius (15 Sekunden) und endete in der Elongation bei 72 Grad Celsius (10 Sekunden).

Tabelle 12: Ansatz je Well für die qRT-PCR

Komponenten je Well	Volumen [ $\mu\text{L}/\text{Well}$ ]
2x SensiFast SYBR & Fluorescein Mix	10 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Vorwärts Primer	0,8 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Rückwärts Primer	0,8 $\mu\text{l}$
Probe	2 $\mu\text{l}$ (2 ng cDNA zu 2 $\mu\text{l}$ )
RNA freies Wasser	6,4 $\mu\text{l}$

## 2.7 Versuchsablauf in vitro und in vivo

### 2.7.1 Besiedlung der Träger mit Zellen

Für die Besiedlung der Träger wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, von den Böden der Zellkulturflaschen mit der Trypsin-/ EDTA-Lösung abgelöst, gezählt und zentrifugiert (siehe 2.3.2). Ab der Besiedelung der Träger mit den Zellen wurde für beide Zellarten EBM Medium verwendet und alle besiedelten Träger wurden in EBM-Medium gelagert. Die zentrifugierten Zellen wurden in EBM-Medium resuspendiert. Das Volumen zur Resuspendierung richtete sich nach der Anzahl der gezählten Zellen und der benötigten Zellanzahl (siehe Tabelle 13). Auf die Träger wurde die ermittelte Menge an Zellsuspension pipetiert. Die Besiedelung der Träger erfolgte 96 Stunden vor Implantation in die Ratten. Bis zur Implantation wurden die besiedelten Träger bei 37 Grad Celsius und 5 % CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank gehalten und nicht adhärente Zellen wurden beim Tauschen des Mediums entfernt. Die Zellen wurden einmal am Tag unter dem Lichtmikroskop auf gesundes Wachstum hin begutachtet. Die Zellen entwickelten sich regelgerecht.

Tabelle 13: Zellanzahl auf Trägern

Trägernummer	Zellart je Träger	Zellanzahl pro Träger
1. und 2.	MSC	200.000
3. und 4.	HUVEC	200.000
5. und 6.	HUVEC und MSC	150.000 und 50.000
7. und 8.	Unbesiedelt	0

### 2.7.2 In-vitro-Kontrollanalysen

Um die Differenzierung der Zellen vor der In-vivo-Implantation zu überprüfen, erfolgten In-vitro-Kontrollanalysen der besiedelten Matrizes. Hierfür wurden zusätzlich zu den für den In-vivo-Versuch vorbereiteten Matrizes, 12 Kontrollträger mit der gleichen Zellanzahl (siehe Tabelle 13) und unter denselben Bedingungen kultiviert (siehe Abbildung 6). Im Anschluss erfolgten PKH- sowie qRT-PCR-Analysen zur Validierung der Besiedlung, Proliferation und Differenzierung.

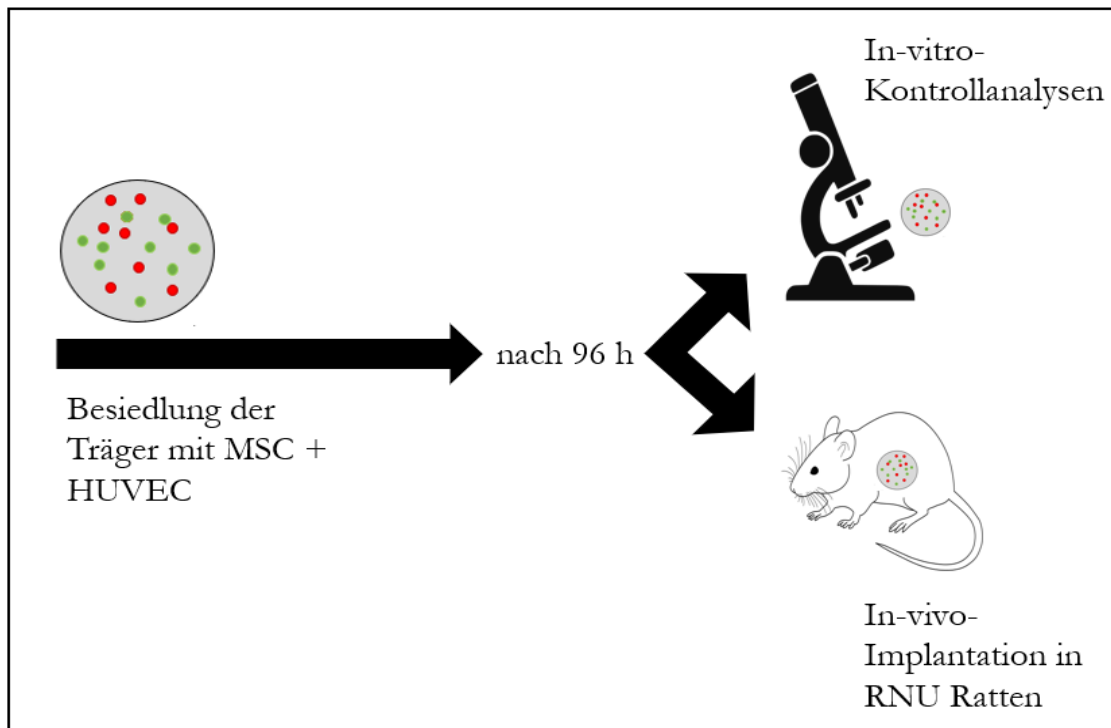


Abbildung 6: Versuchsablauf. Mikroskop: ben at Openclipart ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope\\_icon\\_\(black\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope_icon_(black).svg)), „Microscope icon (black)“, <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/legalcode>. Ratte: Gwilz ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vector\\_diagram\\_of\\_laboratory\\_mouse\\_\(black\\_and\\_white\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vector_diagram_of_laboratory_mouse_(black_and_white).svg)), <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>

### 2.7.3 In-vivo-Implantation

Die Haltung und die Operationen der Versuchstiere wurden in den Räumen und nach den Richtlinien der zentralen Tierversuchseinrichtung der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) durchgeführt (Tierversuchsantrag Aktenzeichen: 33.14-42502-04-13/1335). Es wurden männliche, 3-4 Monate alte RNU-Ratten (Rowett Nude-Ratten) verwendet (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld). Die RNU-Ratten (*Rattus norvegicus*) besaßen keinen Thymus und konnten keine funktionstüchtigen T-Lymphozyten ausbilden und somit eventuelle immunologische Reaktionen auf die xenogenen Transplantate eingeschränkt werden. Für die Implantation wurden die Tiere narkotisiert (Isofluran 2,5 % und Sauerstoff 5 L/min), analgisiert (Buprenorphin 0,05 mg/kg KG) und es wurden jeweils zwei Träger subkutan in die rechte und linke Flanke, in Höhe der Schulter- und Hüftgegend eingebracht. Zu diesem Zweck wurde das Fell an den jeweiligen Stellen geschoren, die Haut desinfiziert und

ein Schnitt der Haut (7 mm) durchgeführt. Daraufhin wurde ein Lager in das subkutane Gewebe präpariert und die vorbehandelten Träger eingesetzt. Die Wunden wurden subkutan mit resorbierbaren und kutan mit nichtresorbierbaren Nähten verschlossen. Die Ratten erhielten nach der Operation zur Analgesie Caprofen (5 mg/ kg KG subkutan). Während der Einheilphase der Träger entstanden weder Wunddehiscenzen noch Infektionen bei den Versuchstieren. Ebenso konnte kein auffälliges oder apathisches Verhalten festgestellt werden. Die Ratten konnten sich in ihren Käfigen frei bewegen, Futter und Wasser standen ihnen frei zur Verfügung. Es wurden insgesamt 12 Ratten operiert. In das subkutane Gewebe jeder Ratte wurden 8 mit Zellen vorbesiedelte Träger (Zellanzahl siehe Tabelle 13) implantiert (zwei Träger in die rechte obere Flanke, zwei Träger in rechte untere Flanke, zwei Träger in die linke obere Flanke und zwei Träger in die linke untere Flanke) (siehe Abbildung 7) und für 14 oder 28 Tage belassen. Nach einem Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen erfolgte unter der Gabe einer peritonealen Anästhesie (Ketamin 100 mg/ kg KG und Medetomidin 0,2 mg/ kg KG) die Entnahme der Träger. Die Entnahmestellen wurden wieder von Fellhaaren befreit, die zugeheilten Narben eröffnet, die Träger aus dem subkutanen Gewebe freipräpariert und in Eppendorf-Röhrchen mit 4 % PFA (Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt) zur weiteren Verwendung konserviert. Postoperativ wurden die Versuchsratten bis zu ihrem natürlichen Tod in der Tierversuchsabteilung der UMG Göttingen gehalten.

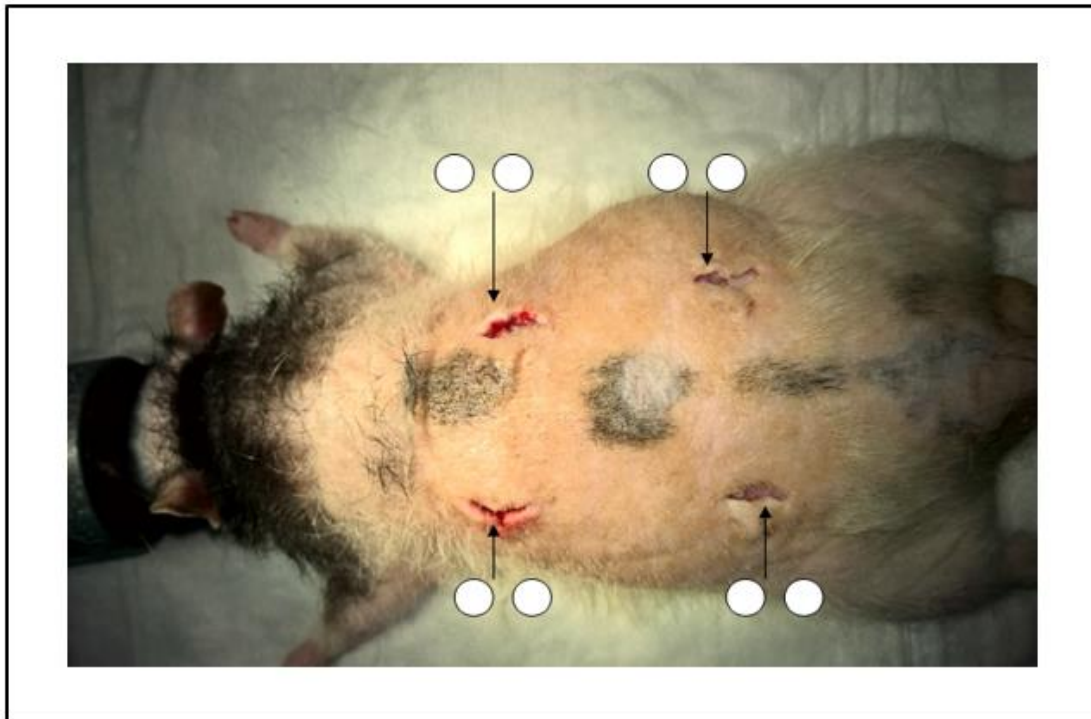


Abbildung 7: Ratte mit Positionierung der Träger; unten links Träger eins und zwei, oben links Träger drei und vier, oben rechts Träger fünf und sechs, unten rechts Träger sieben und acht (Negativkontrolle); Zellbesiedlung siehe Tabelle 13

## 2.8 Einbetten der Proben in Technovit und Zuschneiden der Träger

Nach der Entnahme der Proben aus den Ratten wurden diese für mindestens 24 Stunden in 4% PFA (Merck, Darmstadt) fixiert. Träger mit den PKH gefärbten Zellen wurden zunächst unmittelbar unter dem konfokalen Lasermikroskop gescannt (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan, siehe Tabelle 2) und anschließend für die geplanten Untersuchungen weiterverarbeitet. Sofern notwendig, erfolgte die Dehydrierung der Matrices in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Merck, Darmstadt), beginnend mit 70 % für 20 Minuten, dann zweimal je 20 Minuten mit 96 % und dreimal für je 20 Minuten mit reinem Alkohol. Danach wurden diese für 72 Stunden in Xylol (Merck, Darmstadt) gelegt, in Methylmethacrylat (Technovit 9100) nach Herstellerangaben eingebettet (Heareus Kulzer, Hanau) und im Kühlschrank bei -3 Grad Celsius für 48 Stunden ausgehärtet. Die Acrylatblöckchen wurden auf Objektträger geklebt (LOCTITE 420 Sofortklebstoff, Henkel, Garching), für 48 Stunden getrocknet und vertikal zu der Achse des Trägers mit einer Diamantbandsäge auf ca. 300 µm Stärke zurückgeschnitten (Donath und Breuner 1982). Folgend wurden die Proben mit einem Trenndünnschliffgerät auf 75 µm Stärke abgeschliffen, mit einer Polierscheibe poliert und standen nun für weiterführende immunhistochemische und lichtmikroskopische Färbungen bereit. Vor den Färbungen (Smith Karagianes, Osteopontin und In-situ-Hybridisierung) wurden die Träger erneut entplastet.

## 2.9 Entplastung und Färbung der Träger mit Smith Karagianes

Um kalzifizierten Knochen darzustellen, wurde die Färbung nach Smith Karagianes benutzt (Smith und Karagianes 1974). Zunächst wurden die Proben dreimal für je 20 Minuten in reinem Xylol entplastet. Es folgte das Einlegen in MEA für 20 Minuten und über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal für je 5 Minuten mit Aceton behandelt und zweimal je 2 Minuten mit Aqua dest. (Aqua destillata) gespült. Nach der Entplastung wurden auf die Schriffe für 30 Sekunden bei 80 Grad Celsius Löfflers Methylenblaulösung 1287 (Merck, Darmstadt) aufgebracht. Dann wurden die Schriffe mit Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Es wurde eine Lösung aus 0,5 g Alizarinrot S 5229 (Merck, Darmstadt) und 45 ml Aqua bidestillata mit einem pH-Wert zwischen 6,0-6,3 hergestellt. Im Anschluss folgte die Behandlung der Proben mit dem vorbereiteten Alizarinrot S bei Zimmertemperatur für 60 Sekunden. Es folgte die Spülung der Schriffe mit Leitungswasser und die Trocknung an der Raumluft. Die Schriffe wurden mit Entellan© Neu 1.07961.0500 (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

## 2.10 Darstellung humaner Zellen mittels In-situ-Hybridisierung

Innerhalb des genetischen Materials von Primaten zeigen sich speziesspezifische Alu-Gensequenzen, die nur auf das Genom von Primaten beschränkt sind (Rowold und Herrera 2000;

Kriegs et al. 2007). Mithilfe markierter DNA-Sonden, die an die Alu-Sequenzen binden, können diese durch eine In-situ-Hybridisierung detektiert werden und somit humane Zellen auf xenogen transplantierten Matrizes eindeutig nachweisen. Die hierfür verwendete DIG (Digoxigenin)-DNA-Sonde bindet komplementär an die zu detektierende DNA-Sequenz (Alu-Sequenz) im Zellkern (siehe Abbildung 8). Für die chromogene In-situ-Hybridisierung (CISH) wurde das ZytoFast Kit (ZytoVision, Bremerhaven) mit einer DIG-markierten ZytoFast-Sonde (DIG-Sonde) verwendet (siehe Tabelle 6). Zunächst wurden die Schliffe entplastet (siehe 2.9) und die Proben wurden für 10 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestellt, mit Aqua dest. gewaschen und abgetupft. Pepsin Solution wurde auf die Proben gegeben, und diese wurden für 20 Minuten im Wärmeschrank gelagert (37 Grad Celsius, in einer feuchten Kammer). Daraufhin wurden die Träger in Aqua dest. eingetaucht, für 15 Minuten in der Heat Pretreatment Solution EDTA inkubiert und in Aqua dest. gewaschen. Infolgedessen wurden 8 µl der ZytoFast DNA (+) Control Probe auf jeden Träger auftragen und 8 µl der ZytoFast DNA (-) Control Probe auf die Negativkontrolle aufgetropft, luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt, versiegelt, für 5 Minuten bei 75 Grad Celsius denaturiert und in einer feuchten Kammer in einem Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius für 60 Minuten aufbewahrt. Nach der Entfernung der Deckgläser folgte das Eintauchen der Proben in Wash Buffer TBS bei 55 Grad Celsius und danach in Wash Buffer TBS bei Raumtemperatur (jeweils 5 Minuten). Weiterhin wurden 3-4 Tropfen Mouse-Anti-DIG aufgetropft, die Träger in einer feuchten Kammer in einem Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius (30 Minuten) abgelegt, in Wash Buffer TBS gewaschen, 3-4 Tropfen Anti-Mouse-HRP-Polymer aufgebracht und in einer feuchten Kammer in einem Wärmeschrank gelagert (30 Minuten bei 37 Grad Celsius). Es erfolgte eine Reinigung der Proben in Wash Buffer TBS, eine Auftragung von 3-4 Tropfen DAB Solution (30 µl DAB Solution A gemischt mit 30 µl DAB Solution B) mit einer anschließenden Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur und eine Reinigung der Objektträger unter laufendem Leitungswasser. Ferner wurde mit Nuclear Blue Solution eine Gegenfärbung für 3-4 Minuten durchgeführt und die Objektträger unter laufendem Leitungswasser gewaschen (2 Minuten). Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Eosin (0,1%) für 90 Sekunden. Die Träger wurden danach in Aqua dest. gesäubert, in Alkohol entwässert (70 % für 1 Minute, zweimal in 96 % für je eine Minute, zweimal in 100 % für je zwei Minuten) und zweimal in Xylol für je zwei Minuten gelegt. Schließlich erfolgte die Eindeckung mit Mounting Solution.



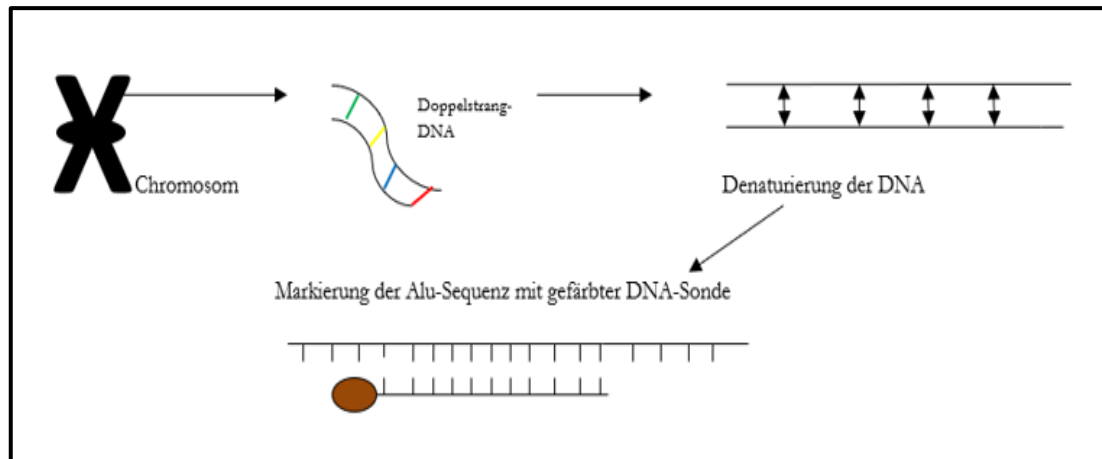


Abbildung 8: Schema der In-situ-Hybridisierung; auf der menschlichen DNA liegende Alu-Sequenzen werden mittels gefärbter DNA-Sonde lichtmikroskopisch sichtbar gemacht; positiv markierte Zellen erscheinen im Lichtmikroskop braun gefärbt

## 2.11 Immunhistochemischer Nachweis mittels Osteopontin

Das Glykoprotein Osteopontin wird von Osteoklasten und Osteoblasten gebildet und in den Knochen eingebaut (Butler 1989). Die Dünnschliffe wurden zunächst entplastet (siehe 2.9). Danach erfolgte die Antigendemaskierung mittels einer EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High pH-Puffers K8004 (Dako A/S, Glostrup, Dänemark) (pH=8,5) in einem Drucktopf bei 121 Grad Celsius (30 Sekunden), dann bei 90 Grad Celsius (10 Sekunden) und einer Abkühlung im Eiswasser (5 Minuten). Die Proben wurden in Aqua dest. gewaschen und die endogene Peroxidase mit je 100 µl Peroxidase Blocking Reagent S2023 geblockt (Dako, Hamburg). In einer feuchten Kammer fanden für 17 Minuten die Inkubation und ein Waschen in PBS statt. Es folgte die Weiterbehandlung der Dünnschliffe mit 10 % Swine Serum Normal X0901 (Dako, Hamburg), dann mit 0,3 % Triton X-100 3051.1 (Carl Roth, Karlsruhe) und eine erneute Inkubation in einer feuchten Kammer (60 Minuten). Als Primärantikörper wurde Osteopontin MP III B10, 1:200 (DSHB, Iowa City, USA) gewählt, für 18 Stunden bei 4 Grad Celsius in einer feuchten Kammer auf den Schliffen belassen und danach mit PBS abgewaschen. Daraufhin inkubierte der Sekundärantikörper Goat Anti-Mouse IgG H+L, 1:1000 (Abcam, Cambridge, England) in einer feuchten Kammer auf den Proben (60 Minuten) und wurde darauffolgend mit PBS ab gespült. Weiterführend wurde ein Ansatz aus 1 ml Liquid DAB-Puffer (Dako, Hamburg) gemischt mit einem Tropfen Substrate Chromogen System K3468 (Dako, Hamburg) hergestellt, 100 µl dieses Ansatzes auf je eine Probe aufgebracht und unter Lichtausschluss inkubiert (15 Minuten). Die Farbreaktion wurde durch Eintauchen in Aqua dest. gestoppt und die Proben mehrmals in Aqua dest. gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 5 Sekunden in frisch filtrierter Mayers Hämalaunlösung HX 87717149 (Merck, Darmstadt). Die Schliffe wurden mit Leitungswasser gesäubert, bis der Farbschleier entfernt war (7 Minuten mit Leitungswasser bläuen lassen). Die Dehydrierung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (75 % für 1 Minute, zweimal 96

% für je 1 Minute, dreimal 100 % für je 1 Minute). Es schloss sich eine Lagerung in Xylol an (dreimal für je 1 Minute). Mit Entellan© Neu 1.07961.0500 (Merck, Darmstadt) wurden die Proben luftblasenfrei eingedeckt und somit haltbar gemacht.

## 2.12 Statistische Auswertung

Die gefärbten Schliffe wurden lichtmikroskopisch mit AxioVert und dem BZ-X Keyence Mikroskop (siehe Tabelle 2) fotografiert. Um die untersuchten Größen zu messen, wurde das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ verwendet (siehe Tabelle 3). Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPadPrism 5.0 (siehe Tabelle 3) zur Hilfe genommen. Es sind jeweils mindestens drei Proben pro Versuch durchgeführt worden. Die morphometrischen Untersuchungen und die Unterschiede im Ausprägungsgrad wurden analysiert mittels statistischer Tests nach Kruskal-Wallis. Für die qRT-PCR wurden das  $\Delta\text{ct}$  mathematische Model für relative Quantifikation (Livak und Schmittgen 2001) und die Analyse nach Mann-Whitney verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Graphen dargestellt und auf Signifikanzen mit dem Test nach Mann-Whitney geprüft. Auf der Ordinate ist die Konzentration des Gens logarithmisch dargestellt ( $\Delta\text{CT}$ -Wert). Auf der Abszisse sind die untersuchten Proben der Zellen von MSC, HUVEC und Kokultur (MSC mit HUVEC) auf den Kalziumkarbonatträgern zu sehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In-vitro-Vitalfärbung mit PKH 26 und 67

Es wurden Fibronektin beschichtete Kalziumkarbonatträger mit PKH gefärbten Zellen besiedelt und nach 96 Stunden unter dem konfokalen Lasermikroskop FV1000 mikroskopiert (in vitro). Die Träger waren von einem dichten Zellrasen bedeckt und die MSC zeigten sich in der erwarteten Rotfärbung, sowie die HUVEC in grün. HUVEC und MSC wiesen ein expandierendes Wachstum auf und organisierten sich zu Zellclustern. Dieses Phänomen war in besonderem Maße in der Kokultur zu beobachten (siehe Abbildung 9).

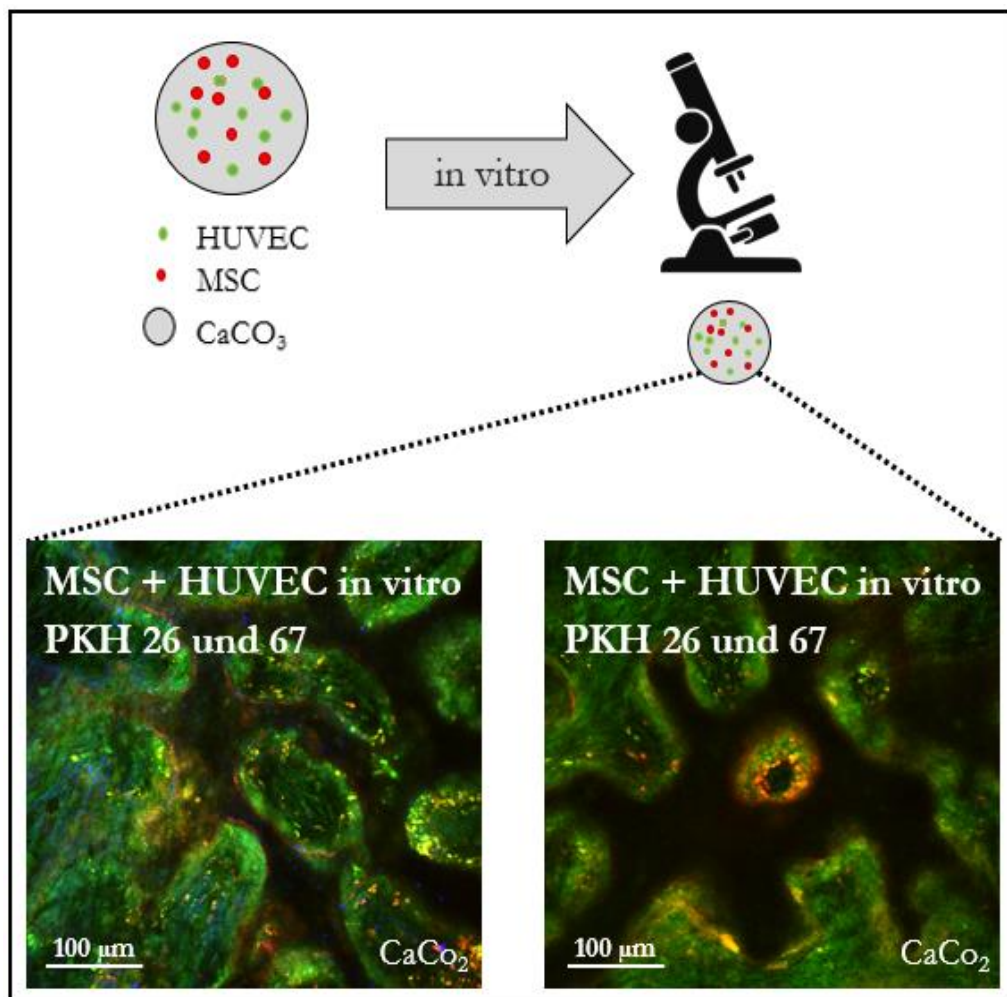


Abbildung 9: Kalziumkarbonatträger wurden mit MSC (gefärbt mit PKH 26) und HUVEC (gefärbt mit PKH 67) besiedelt; diese wurden nach 96 Stunden in vitro mikroskopiert.

Mikroskop: siehe Abbildung 6

#### 3.2 In-vivo-Vitalfärbung mit PKH 26 und 67

Weitere Träger, die mit PKH gefärbten Zellen besiedelt waren, wurden nach 14 und 28 Tagen aus den Ratten explantiert und unter dem konfokalen Lasermikroskop FV 1000

gescannt (in vivo, siehe Abbildung 10). Der Kalziumkarbonatträger besaß eine blaue Eigenfluoreszenz. Die Zellen leuchteten weiterhin in den erwarteten Farben (MSC in Rot und HUVEC in Grün) und zeigten eine Vermehrung der Zellanzahl auf. Auf den Trägern, die mit MSC und HUVEC kobesiedelt waren, gruppierten sich die Zellen zu Clustern. Diese Cluster standen über tubuläre Strukturen, die von den HUVEC gebildet worden waren, miteinander in Kontakt.

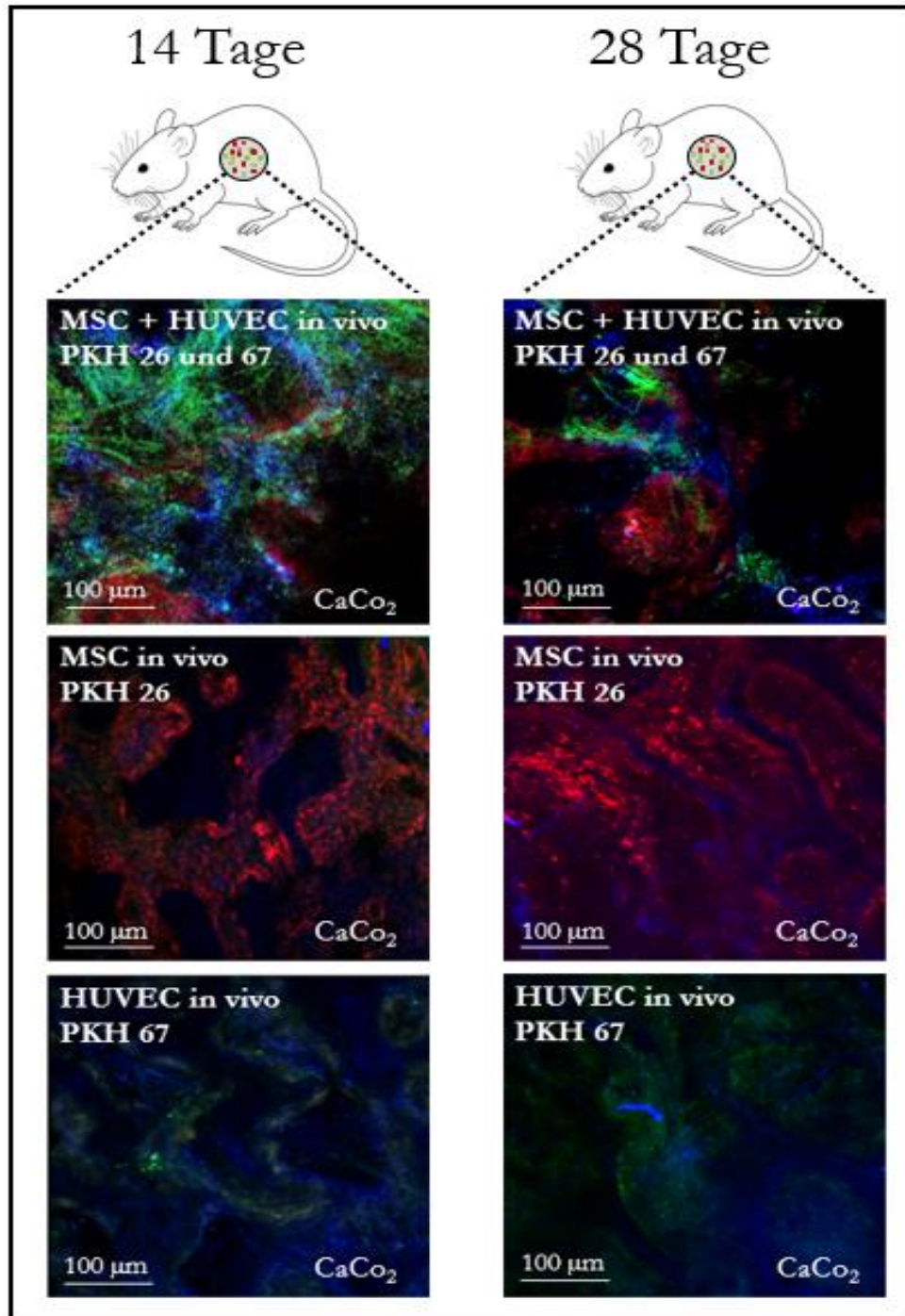


Abbildung 10: Kalziumkarbonatträger (blau) mit MSC (rot, PKH 26) und HUVEC (grün, PKH 67) nach Explantation aus Ratte (14 und 28 Tage Verweildauer). Ratte: siehe Abbildung 6

### 3.3 Expression von osteogenen und angiogenen Faktoren

#### 3.3.1 CD31, VEGF und vWF

CD31 wurde in der Gruppe der HUVEC mehr exprimiert als in der Gruppe der Kokultur. Die Expression von CD31 war bei den HUVEC im Vergleich zu den MSC signifikant höher ( $p = 0,02$ ). Dies zeigte sich ebenfalls in der Kokultur. Hier war die Expression von CD31 ebenfalls signifikant erhöht ( $p = 0,006$ ). VEGF wurde in den Gruppen der MSC und HUVEC ähnlich stark exprimiert, es konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Auch in der Kokultur wurde VEGF deutlich exprimiert. Diese Expression war jedoch im Vergleich zu der Gruppe der MSC signifikant reduziert ( $p = 0,05$ ). In der Kokultur stellte sich die Expression von vWF in einem etwas höherem Maße als in den beiden Vergleichsgruppen dar, war jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 11).

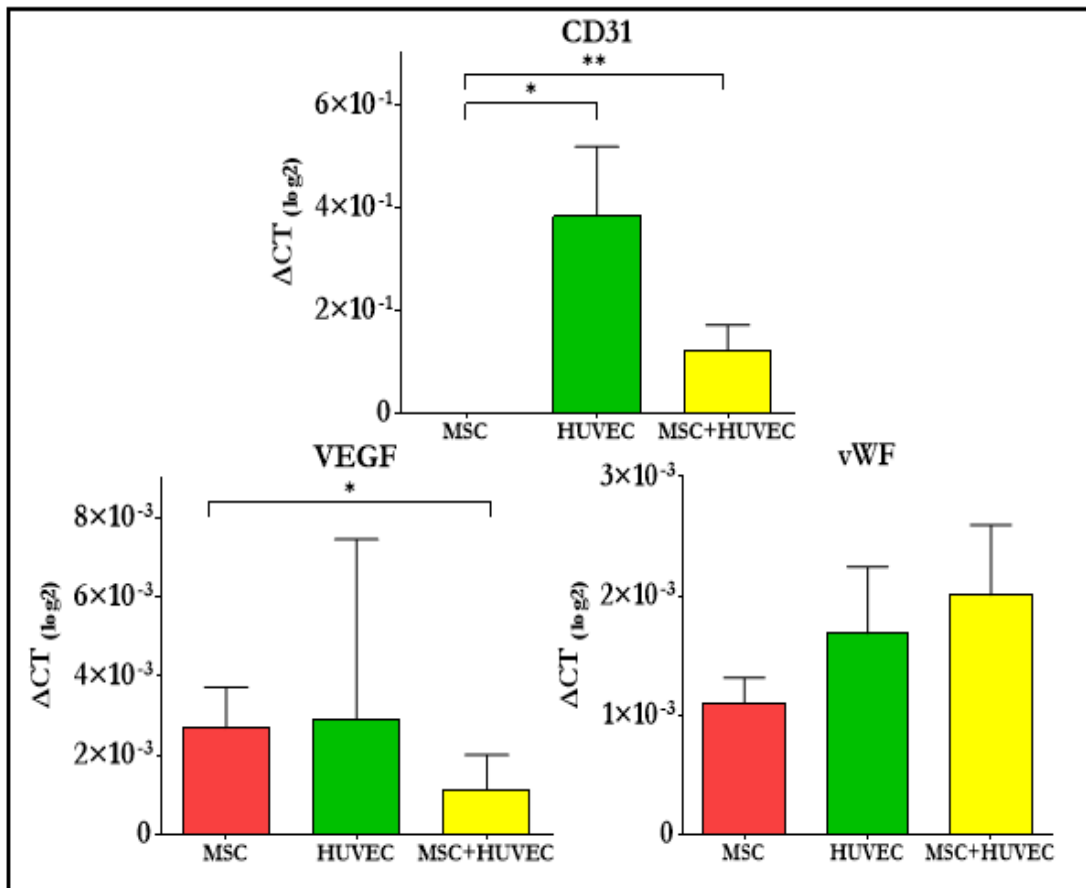


Abbildung 11: Expression von CD31, VEGF und vWF in den Proben der Gruppen der MSC und HUVEC, sowie in der Kokultur. Relative Proteinexpression (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,006$ )

#### 3.3.2 OPG, Runx2 und Osteonectin

OPG wurde in der Gruppe der MSC signifikant mehr exprimiert als in der Gruppe der HUVEC ( $p = 0,02$ ). Ebenso exprimierten MSC signifikant mehr OPG als die Kokultur

( $p = 0,04$ ). In der Gruppe der HUVEC wurde signifikant weniger Runx2 und Osteonectin exprimiert als in der Gruppe der MSC (Runx2  $p = 0,03$  und Osteonectin  $p = 0,02$ ). Die Kokultur exprimiert signifikant mehr Runx2 und Osteonectin als die Gruppe der HUVEC (Runx2  $p = 0,02$  und Osteonectin  $p = 0,0006$ ) (siehe Abbildung 12).

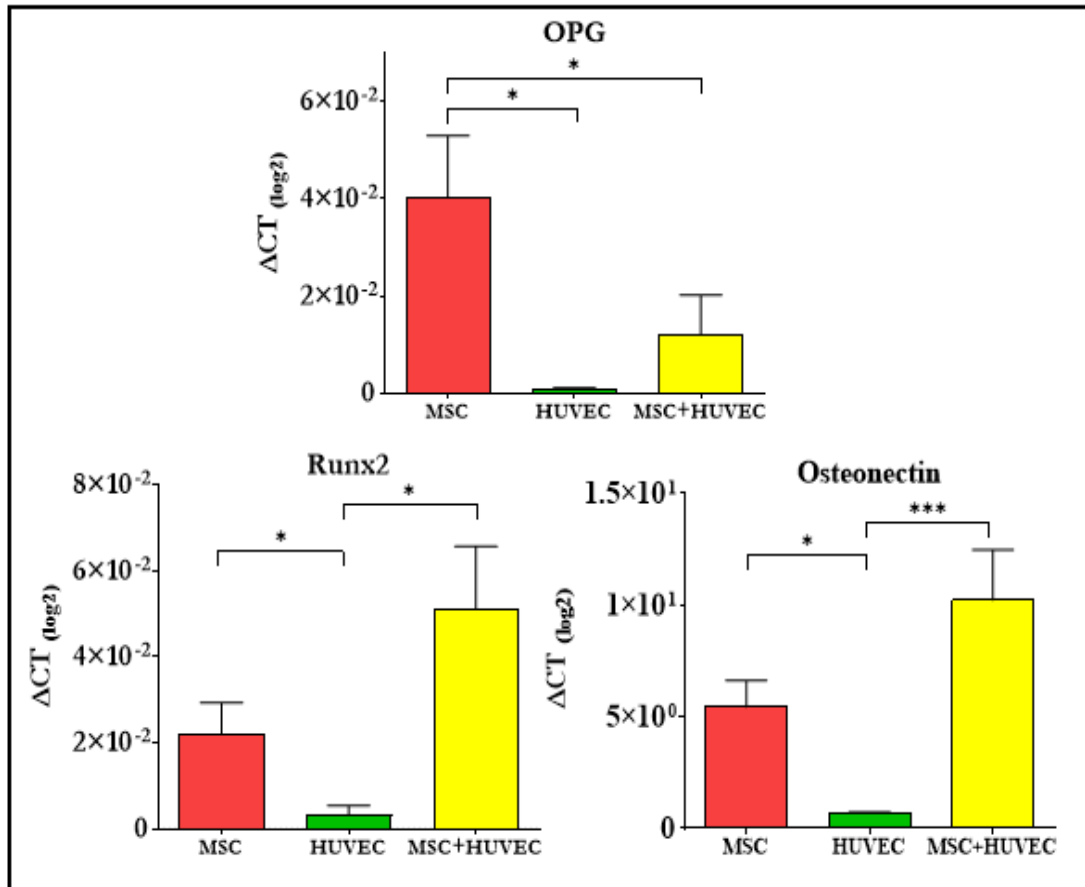


Abbildung 12: Expression von OPG, Runx2 und Osteonectin in den Proben der Gruppen der MSC und HUVEC, sowie in der Kokultur. Relative Proteinexpression (\* =  $p \leq 0,04$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,0006$ )

### 3.4 CISH zur Detektierung humaner Zellen

Die Gruppe der MSC zeigte nach 14 Tagen den höchsten Anteil positiver Signale mithilfe der immunhistochemischen Färbung verglichen mit der Gruppe der HUVEC ( $p = 0,0001$ ) und der Kokultur ( $p = 0,0001$ ) (siehe Abbildung 13). Nach 28 Tagen konnten weniger positive Signale in allen drei Gruppen detektiert werden, wobei auf dem Träger mit den MSC wieder die signifikant mehr positiven Signale zu finden waren als auf den Trägern mit den HUVEC ( $p = 0,0001$ ) und der Kobesiedlung ( $p = 0,0001$ ) (siehe Abbildung 14).

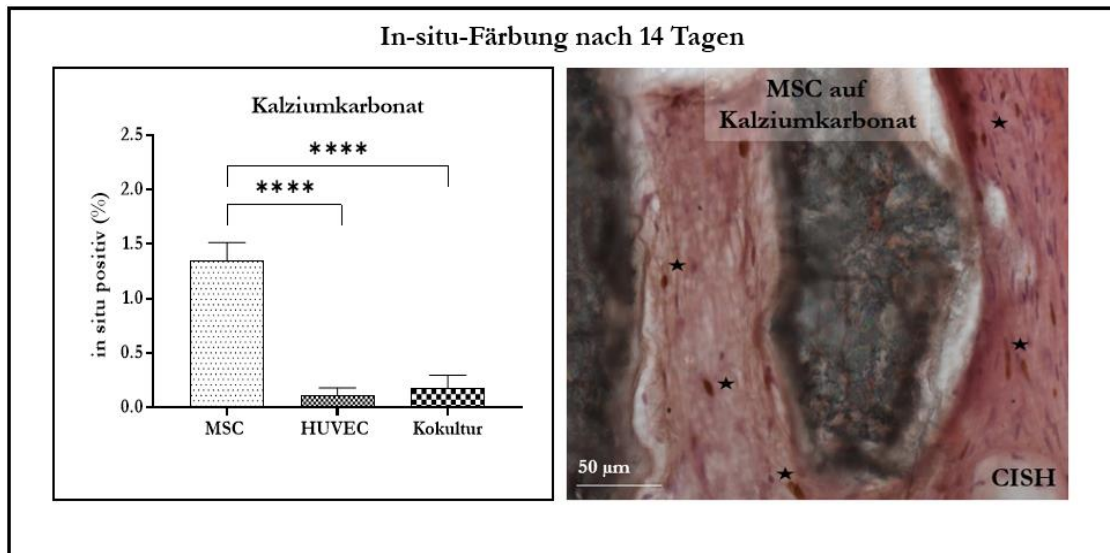


Abbildung 13: Anzahl der in situ positiven Zellen in Prozent nach 14 Tagen; positiv gefärbten Zellen (braun) sind mit Stern gekennzeichnet (\*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

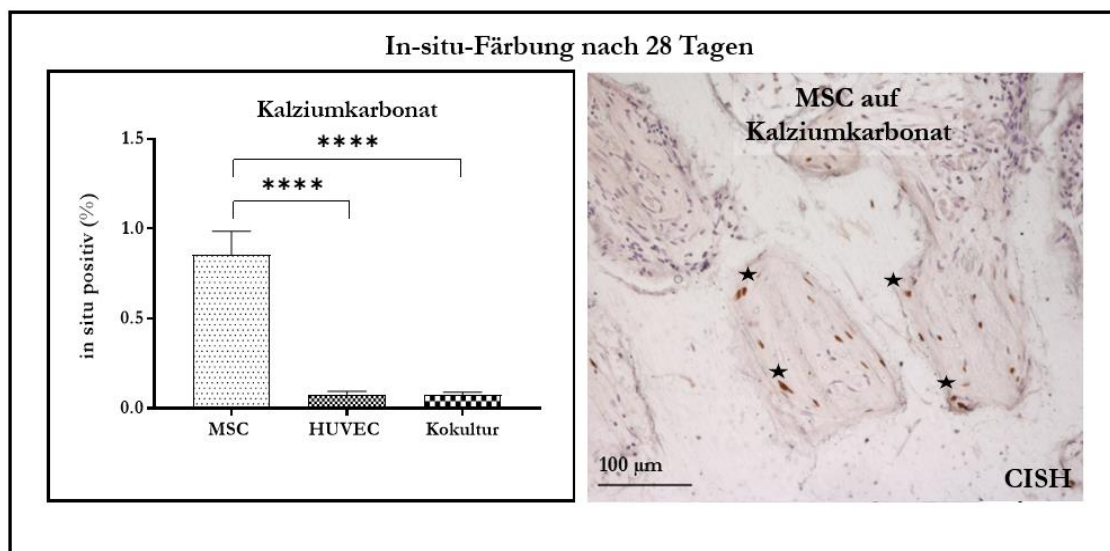


Abbildung 14: Anzahl der in situ positiven Zellen in Prozent nach 28 Tagen; positiv gefärbte Zellen (braun) sind mit Stern gekennzeichnet (\*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

### 3.5 Neovaskularisierung auf in vivo präkultivierten Matrizes

Nach 14-tägigem Verbleib der Träger in den Ratten stieg die Gefäßanzahl im Vergleich zu den unbesiedelten Trägern signifikant bei der MSC-Gruppe ( $p = 0,0001$ ) und der HUVEC-Gruppe ( $p = 0,001$ ) an (siehe Abbildung 15). Diese signifikant erhöhte Gefäßanzahl war auch nach 28 Tagen nach Implantation der Träger in die Ratten bei der MSC-Gruppe ( $p = 0,005$ ), der HUVEC-Gruppe ( $p = 0,003$ ) und sogar bei der Kokultur-Gruppe ( $p = 0,04$ ) feststellbar (siehe Abbildung 16). Zusammenfassend zeigte sich, dass die Vaskularisation in vivo auf den prävaskularisierten Trägern höher war als auf den unbesiedelten Kontrollträgern.

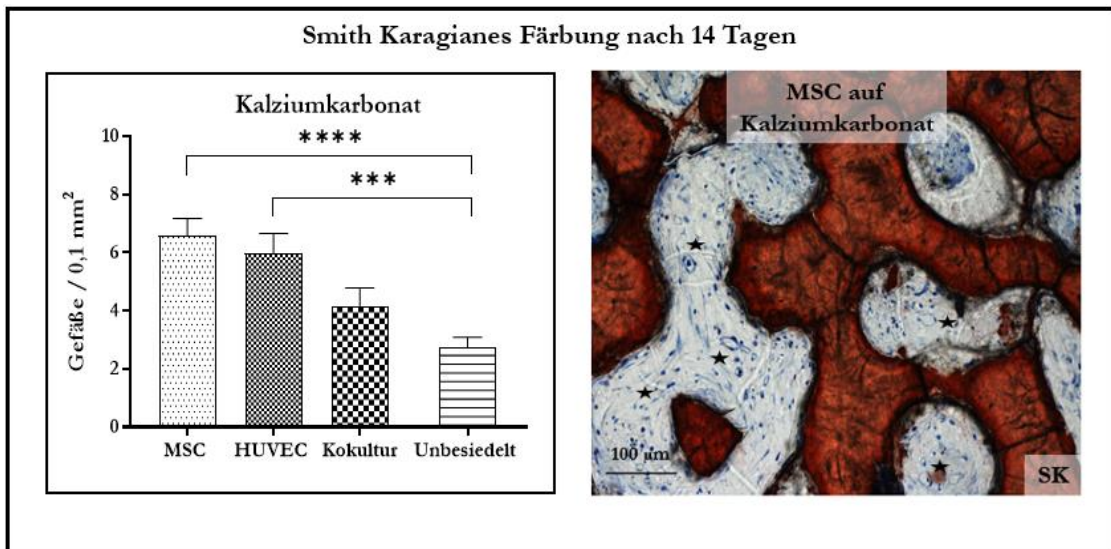


Abbildung 15: Gefäßanzahl pro 0,1 mm<sup>2</sup> auf Kalziumkarbonatträgern nach 14 Tagen; GefäÙe blau (mit Stern gekennzeichnet), mineralisierter Träger braun (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

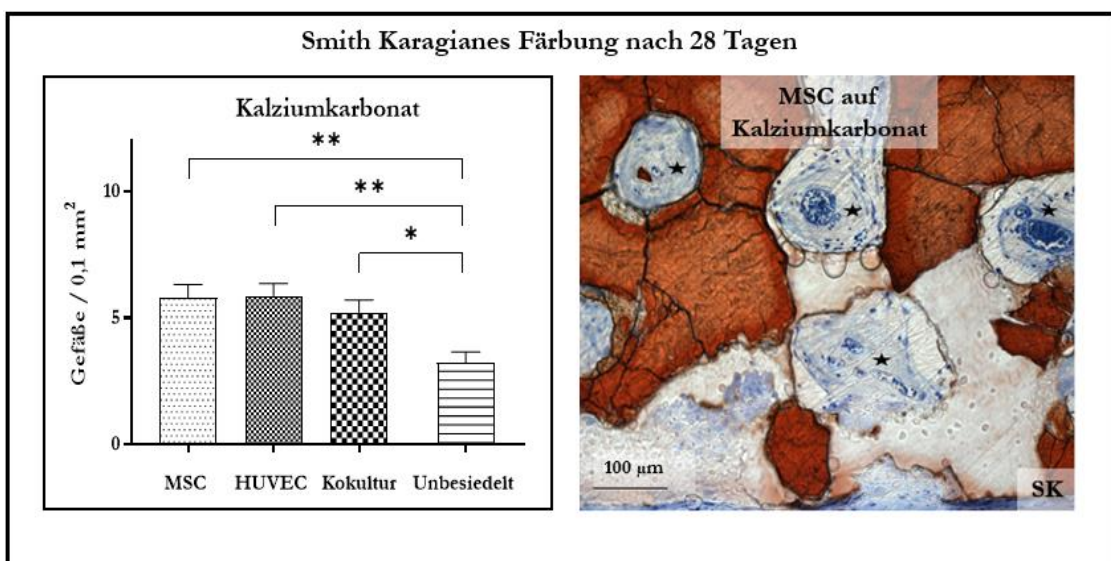


Abbildung 16: Gefäßanzahl pro 0,1 mm<sup>2</sup> auf Kalziumkarbonatträgern nach 28 Tagen; GefäÙe blau (mit Stern gekennzeichnet), mineralisierter Träger braun (\* =  $p \leq 0,04$ ; \*\* =  $p \leq 0,005$ )

### 3.6 Mineralisation auf in vivo präkultivierten Matrices

#### 3.6.1 Smith Karagianes

Die Auswertung der Smith Karagianes Färbung in vivo zeigte einen erhöhten Mineralisationsgrad auf den prävaskularisierten Trägern im Vergleich zu den unbesiedelten Kontrollträgern. Die MSC- und die Kokultur-Gruppe brachte eine signifikant erhöhte Mineralisation im



Vergleich zur unbesiedelten Kontrollgruppe nach 14 Tagen hervor (für die MSC-Gruppe  $p = 0,004$ , für die Kokultur-Gruppe  $p = 0,0001$ ). Die Gruppe der Kokultur entwickelte eine signifikant erhöhte Mineralisation gegenüber den HUVEC ( $p = 0,04$ ). Jedoch zeigte sie im Vergleich zur MSC-Gruppe keine Signifikanz auf (siehe Abbildung 17). Die Signifikanz der MSC-Gruppe zur unbesiedelten Kontrollgruppe blieb auch nach 28 Tagen bestehen ( $p = 0,01$ ), andere Signifikanzen waren aber nicht mehr feststellbar (siehe Abbildung 18).

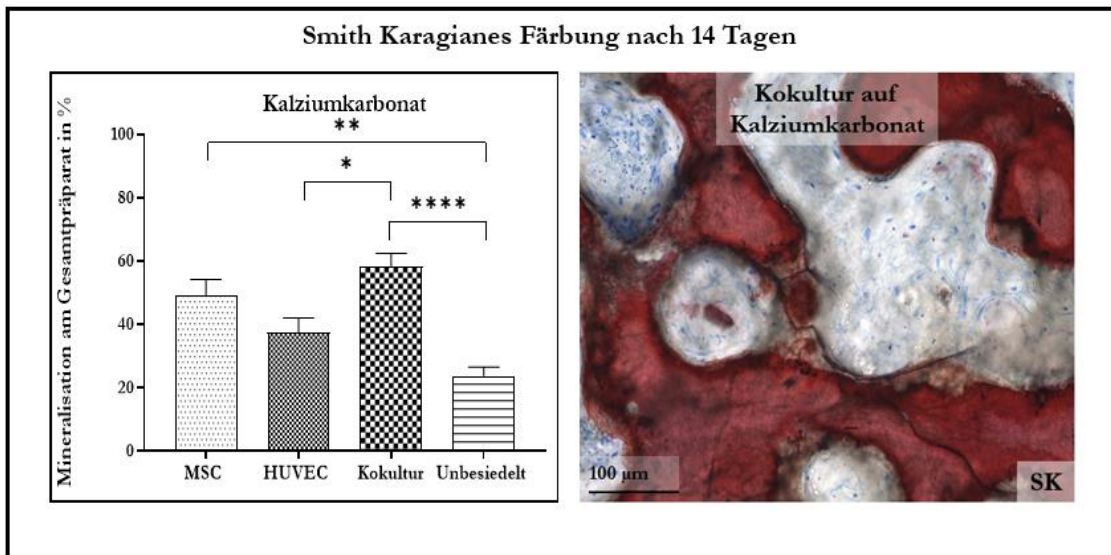


Abbildung 17: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat in Prozent nach 14 Tagen, Mineralisation braun (\* =  $p \leq 0,04$ ; \*\* =  $p \leq 0,004$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

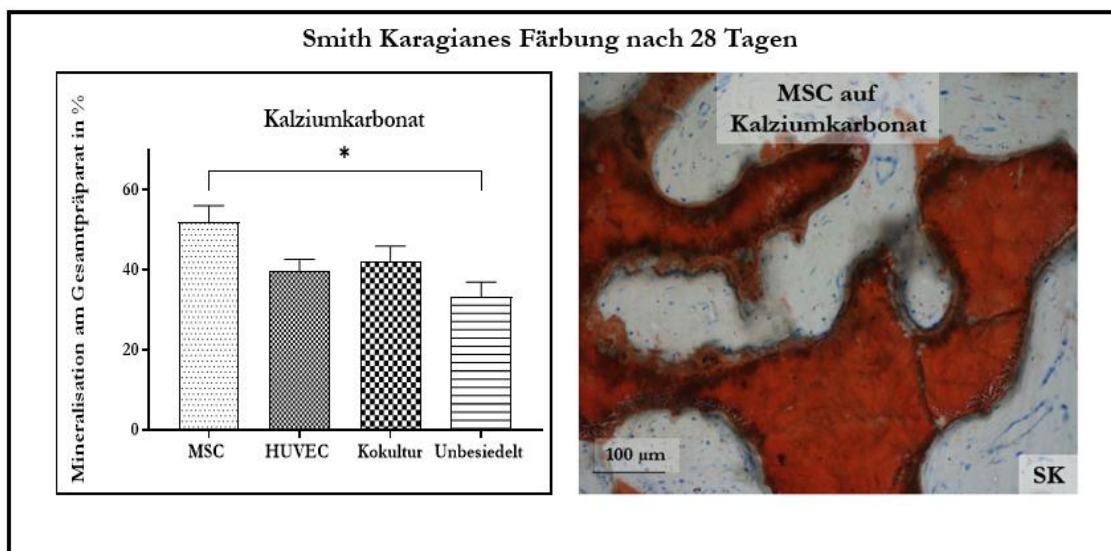


Abbildung 18: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat in Prozent nach 28 Tagen, Mineralisation braun (\* =  $p \leq 0,01$ )

### 3.6.2 Osteopontinexpression auf in vivo präkultivierten Matrices

Bei der Untersuchung der Proben mit Hilfe der immunhistochemischen Osteopontinfärbung konnte nach 14 Tagen eine signifikant erhöhte Osteopontinbildung in der MSC- und

Kokultur-Gruppe im Vergleich zur Negativgruppe festgestellt werden (MSC  $p = 0,0001$ , Kokultur  $p = 0,0001$ ). MSC und die Kokultur zeigten sich signifikant erhöht gegenüber den HUVEC ( $p = 0,04$ ). Die HUVEC-Gruppe erreichte keine signifikanten Werte (siehe Abbildung 19). Dies änderte sich jedoch nach 28 Tagen. Nach diesem Zeitraum waren alle drei Gruppen im Vergleich zur Negativgruppe signifikant, wobei die MSC-Gruppe die höchste Signifikanz aufwies (MSC  $p = 0,0001$ , HUVEC  $p = 0,002$ , Kokultur  $p = 0,0006$ ) (siehe Abbildung 20).

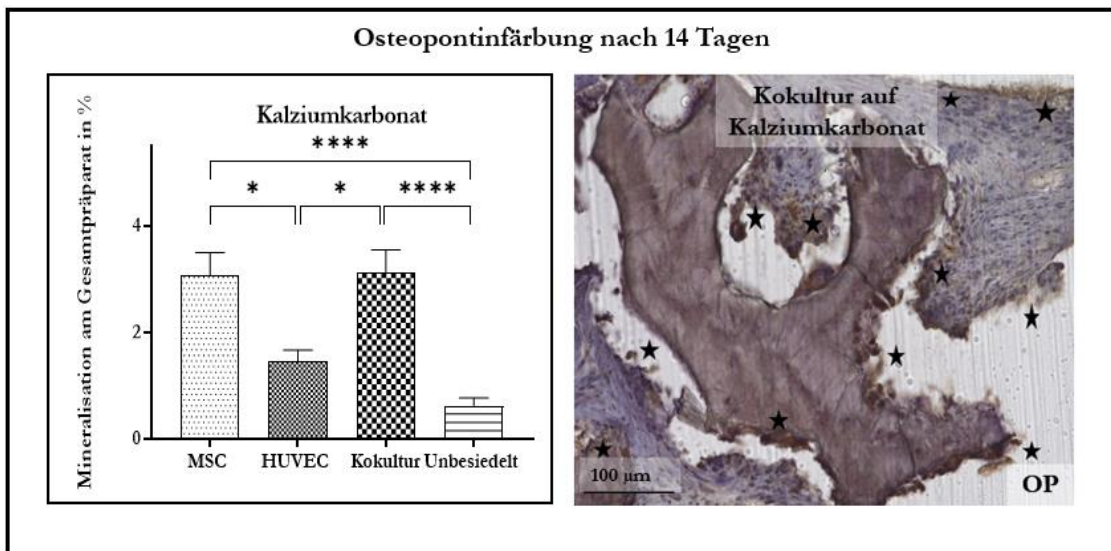


Abbildung 19: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat in Prozent nach 14 Tagen; positiv gefärbtes Gewebe braun (mit Stern gekennzeichnet) (\* =  $p \leq 0,04$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

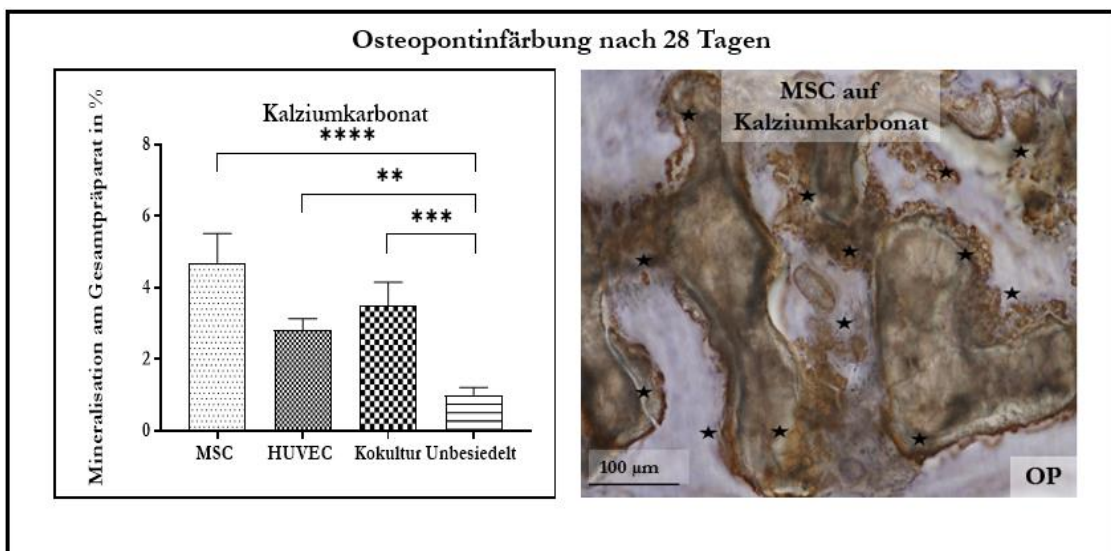


Abbildung 20: Anteil der Mineralisation am Gesamtpräparat in Prozent nach 28 Tagen; positiv gefärbtes Gewebe braun (mit Stern gekennzeichnet) (\*\* =  $p \leq 0,002$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,0006$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ )

## 4 Diskussion

### 4.1 In-vivo-Nachweis von MSC und HUVEC mit Hilfe von CISH

Mit Hilfe der CISH-Färbung konnten auf den Trägern humane Zellen nach 14 und nach 28 Tagen Inkubation in den RNU-Ratten detektiert werden. Sowohl nach 14 Tagen als auch nach 28 Tagen waren signifikant mehr positive Signale bei den MSC zu finden (\*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). Insgesamt ging die Anzahl menschlicher Zellen zurück. Um die Abstoßungsreaktion zwischen den in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen und den Ratten so gering wie möglich zu halten, wurden atymische RNU-Ratten ausgewählt. Diese zeigten in anderen Untersuchungen bezüglich Tissue Engineering gute Ergebnisse (Wang et al. 2019) und reduzieren die Gefahr einer immunologischen Antwort auf menschliches Material (Bhamb et al. 2019). Jedoch kann eine Eliminierung menschlicher Zellen durch das Immunsystem der RNU-Ratten im Tiermodell nicht zur Gänze ausgeschlossen werden (Hougen 1991; Rolstad 2001).

### 4.2 Zelluläre Präkultivierung resultiert in einer Veränderung der Angiogenese

Eine optimale Regeneration und Differenzierung erfordern eine Anbindung an eine suffiziente vaskuläre Versorgung transplantiertes Gewebe. Daher wird die Differenzierung von neuen Gefäßen innerhalb von osteogenen Transplantaten angestrebt (Chen X et al. 2018). Gewünscht ist eine Verbindung zwischen Transplantatgewebe und -bett durch das Einsprossen von Kapillaren (Shanbhag et al. 2016), um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie den Abtransport von Stoffwechselmetaboliten im Inneren des Transplantats zu gewährleisten (Rao et al. 2012). Im Fokus stehen daher endotheliale und mesenchymale Zellen, da diese u.a. die Gefäßentstehung unterstützen und stabilisieren (Joensuu et al. 2018; Kocherova et al. 2019). So konnte beschrieben werden, dass Kokulturen von HUVEC und MSC in vitro eine vermehrte angiogene Differenzierung bewirken können (Liu et al. 2013; Seebach et al. 2012; Fu et al. 2014; Pirraco et al. 2014; Böhrnsen und Schliephake 2016). Dies erklärt sich durch die perizytäre, proangiogene Unterstützung der endothelialen Differenzierung von HUVEC durch MSC, indem proangiogene Wachstumsfaktoren (wie z. B. VEGF) exprimiert werden (Furumatsu et al. 2003). Das Fehlen dieser zellulären Strukturen führt dagegen oft zu einer insuffizienten Angiogenese (Rao et al. 2012; Kocherova et al. 2019). In dieser Studie stellte sich auf den Trägern eine erhöhte Expression von vWF dar, der als angiogener Marker bei der Gefäßneubildung von endothelialen Zellen gebildet wird und in der Kokultur am stärksten ausgeprägt war (Böhrnsen und Schliephake 2016; Chen W et al. 2018; Randi et al. 2018). Zudem zeigte sich, dass eine zelluläre Präkultivierung in einer signifikant verbesserten angiogenen Differenzierung resultieren kann (HUVEC \*\*\* =  $p \leq 0,001$  und MSC \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). Trotz vermehrter Gefäßbildung in der Kokultur stellte sich diese nach 14 Tagen

als noch nicht signifikant unterschiedlich zu den unbesiedelten Trägern heraus. Eine signifikante Verbesserung präsentierte sich erst nach 28 Tagen. Darüber hinaus wiesen endothelial besiedelte Träger eine noch höhere Gefäßanzahl als die Träger der Kokultivierung auf. Diese war nach 14 Tagen bereits signifikant ( $*** = p \leq 0,001$ ) gegenüber den unbesiedelten Trägern und blieb es auch nach 28 Tagen ( $** = p \leq 0,005$ ). Endothelial präkultivierte Träger präsentierten zudem erwartungsgemäß die höchste Expression von CD31 (Usuda et al. 2018). Entgegen der Annahme, dass MSC die angiogene Funktion der HUVEC in der Kokultur unterstützen und fördern (Hofmann et al. 2008), zeigte die Kokultivierung von HUVEC und MSC jedoch eine geringere CD31 Expression (Kang et al. 2013). Da CD31 zudem als interzelluläres endotheliales Zelladhäsionsmolekül agiert, können diese Verbindungen durch eine Kokultivierung gestört werden (Kang et al. 2013). Darüber hinaus wird CD31 kaum von hMSC exprimiert (Lin et al. 2013). Oskowitz et al. (2011) schrieben MSC jedoch einen relevanten proangiogenen Effekt zu. Ebenso werden MSC in Untersuchungen auf Zellkulturebene eine bedeutende Rolle beim Aufbau und der Stabilisation von Gefäßen zugeteilt (Schott et al. 2021). Von allen Trägern zeigen MSC präkultivierte Träger die höchste Gefäßanzahl nach 14 Tagen. In dem kürzeren Beobachtungszeitraum wurde deutlich, dass eine zelluläre Präkultivierung unabhängig von der Zellzusammensetzung eine Vermehrung der Gefäßanzahl im Gegensatz zu einer Nichtbesiedlung hervorbringt. Auch nach einem längeren Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ist dieser angiogene Effekt noch deutlich. In vivo stellte sich jedoch kein Vorteil einer gleichzeitigen Anwesenheit von MSC und HUVEC ein. Die Gefäßanzahl war bei den HUVEC und den MSC nach 28 Tagen vergleichbar. Diese Resultate decken sich ebenfalls mit denen der Expression von VEGF. Das Expressionsniveau von VEGF erwies sich bei MSC und HUVEC als stabil. Die Kokultur präsentierte hingegen keinen vermehrten Anstieg von VEGF. Jedoch sind nach längeren Beobachtungszeiträumen höhere VEGF Expressionen in Kokulturen nachgewiesen worden (Chiesa et al. 2020).

Zusammenfassend zeigten unsere Analysen, dass eine zelluläre Präkultivierung unabhängig von der Kokultivierung zu einer signifikant verbesserten angiogenen Differenzierung beitragen kann. Melchiorri et al. (2014) beschrieben ebenfalls einen verringerten suffizienten Gefäßanteil in kokulturell besiedelten Trägern in vitro. Eine Mischung von HUVEC und MSC kann zu einem reduzierten Zell-Zell-Kontakt führen und somit den Aufbau mikropapillärer Strukturen verhindern. Zudem ist es möglich, dass die robustere Proliferation und Differenzierung der hMSC das sensiblere Wachstum der HUVEC mindern (Kang et al. 2013).

### 4.3 Zelluläre Präkultivierung resultiert in einer Veränderung der Mineralisation

Neben dem Einsatz geeigneter Trägermaterialien, wie das in dieser Arbeit verwendete Kalziumkarbonat, gilt die Nutzung von angiogenen und osteogenen Vorläuferzellen als eine Methode im Bereich des Tissue Engineerings, um die Knochenregeneration zu steigern (Hutchings et al. 2020). Durch den Gebrauch von MSC und HUVEC kann die Osteogenese gefördert werden (Chen J et al. 2018). Mit Hilfe der Färbung nach Smith Karagianes und Osteopontin konnte nach einem Zeitraum von 14 Tagen *in vivo* eine Steigerung der Mineralisation auf den präkultivierten Trägern festgestellt werden. Die Proben mit der Kokultivierung zeigten dabei die stärkste Tendenz zur Mineralisation. Diese war signifikant ( $**** = p \leq 0,0001$ ) zu den unbesiedelten Trägern. Auch Deng et al. (2017) konnten in ihrer Studie bei Trägern mit einer Kokultivierung eine verstärkte Mineralisation bestimmen. Ebenso konnte in unserer Studie bei dem osteogenen Marker Osteonectin in der Kokultur die stärkste Expression gezeigt werden. Dies weist auf einen synergistischen osteogenen Effekt der Kokultur hin, den bereits Böhrnsen und Schliephake in ihrer Arbeit zeigen konnten (Böhrnsen und Schliephake 2016). Runx2, der als weiterer osteogener Marker in dieser Arbeit untersucht wurde, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten und somit auf das Knochenwachstum (Ziros et al. 2008). Auch hier konnte in der Kokultivierung eine höhere Expression als bei den MSC festgestellt werden, was auf den unterstützenden osteogenen Effekt der Kokultur hinweist. Während Kang et al. (2013) in ihrer Studie eine vermehrte Expression von Runx2 in der Gruppe der MSC zeigen konnten, zeigten weiterführende Untersuchungen, dass Runx2 in der Kokultur im Vergleich zu MSC-Monokulturen durchaus vermehrt exprimiert werden kann (Bidarra et al. 2011; Chen J et al. 2018).

*In vivo* zeigt die Auswertung der Färbungen nach Smith Karagianes und Osteopontin nach 28 Tagen ebenfalls eine erhöhte Mineralisation auf den prävaskularisierten Trägern im Vergleich zu den unbesiedelten Kontrollträgern. Hervorzuheben ist, dass die Besiedlung nur mit MSC bei einem längeren Beobachtungszeitraum (28 Tage) hier einen Vorteil bietet. Dieser osteogene Vorteil war gegenüber den Kontrollträgern signifikant (Smith Karagianes  $* = p \leq 0,01$  und Osteopontin  $**** = p \leq 0,0001$ ). Ebenso konnten Zhang B et al. (2017) in ihrer Studie nach einer ähnlich langen Untersuchungszeit eine erhöhte Mineralisation auf Trägern, die mit MSC präkultiviert wurden, beschreiben. Auch die Expression von Osteoprotegerin war bei der MSC-Kultivierung im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant ausgebildet ( $* = p \leq 0,04$ ). Zudem wird OPG von mesenchymalen Stammzellen exprimiert (Corallini et al. 2011; Lee et al. 2017) und wirkt über das Osteoprotegerin-/ RANKL-System Osteoklasten hemmend und somit pro-osteogen (Haubeck 2019; Rochette et al. 2019). Entgegen der Annahme, dass auch HUVEC OPG ausbilden (Zannettino et al. 2005; Corallini et al. 2011; Rochette et al. 2019), konnte in dieser Gruppe eine nur sehr geringfügige Expression festgestellt werden. Der osteogene Vorteil der Kokultur, der sich innerhalb der ersten 14 Tage

gezeigt hatte, ging nach einem längeren Beobachtungszeitraum *in vivo* verloren. In der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse zu finden, ob eine Kokultivierung mit beiden Zellarten zu einer erhöhten Mineralisation und somit zu einer erhöhten Knochenentwicklung führen kann. In einigen *In-vitro*-Studien zeigte sich ein Vorteil der Kokultur (Correia et al. 2011; Oryan et al. 2014; Böhrnsen und Schliephake 2016). Durch ein Zusammenbringen von HUVEC und hMSC können die HUVEC ein die hMSC unterstützendes Verhalten hervorbringen, welches sich in einer stärkeren osteogenen Differenzierung der hMSC zeigt (Bidarra et al. 2011; Steiner et al. 2012). Jedoch konnte im Gegensatz dazu in anderen Studien kein Vorteil festgestellt werden (Cornejo et al. 2012; He et al. 2012; Kuss et al. 2018), was mit den *In-vivo*-Ergebnissen dieser Arbeit über eine längere Inkubationszeit übereinstimmt. Laut Meury et al. (2006) konnte sogar eine erschwerte Osteoblastendifferenzierung in Gegenwart von Endothelzellen gezeigt werden. Bei der Wahl einer Kobesiedlung besteht die Schwierigkeit, die Umgebung der Zellkultivierung (z. B. Kulturmedium) so zu wählen, dass sowohl die Angiogenese als auch die Osteogenese gefördert wird, ohne eine der beiden Differenzierungen zu beeinflussen (Schott et al. 2021). Ein weiterer Grund für ein negatives Ergebnis kann ein ungünstiges Verhältnis der Zellzahl von HUVEC zu hMSC in der Besiedlung der Träger sein. Als zusätzliche Regulierungsmöglichkeit für weiterführende Arbeiten kann das Verhältnis verändert werden, um das osteogene und angiogene Potential dieser Zellen besser ausschöpfen zu können (Correia et al. 2011; Kang et al. 2013). In der Literatur sind jedoch inhomogene Aussagen zum Besiedlungsverhältnis von HUVEC zu hMSC zu finden (Kirkpatrick et al. 2011; Rao et al. 2012; Ma et al. 2014; Carvalho et al. 2019; Kocherova et al. 2019)

#### 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine Präkultivierung nur mit MSC einen potenten angiogenen und osteogenen Effekt hat. Somit sollte in weiterführenden Arbeiten die Frage diskutiert werden, ob HUVEC für *In-vivo*-Versuche geeignet sind, oder weitere Versuche nur mit MSC geplant werden, da diese ein robustes Wachstum in xenogenen Geweben zeigen und in der Zellkultur einfach zu kultivieren sind (Fabre et al. 2019). HUVEC dagegen sind in der Kultivierung anfälliger für Infektionen und reagieren empfindlicher auf Störungen in der Zellkultur. Sie reagieren auf die Zusammenstellung des Kulturmediums sensibel (Kocherova et al. 2019). Darüber hinaus sind die optimalen Kultivierungsbedingungen für endotheliale Zellen aktuell noch Teil wissenschaftlicher Untersuchungen (Dong et al. 1997; Sobczak et al. 2010; Dömer et al. 2021). Auch die Wahl der Zelldichte in der Kokultivierung mit MSC hat Auswirkung auf das Wachstum der HUVEC (Kirkpatrick et al. 2011; Rao et al. 2012; Ma et al. 2014; Carvalho et al. 2019; Kocherova et al. 2019). Diese Sensitivitäten können dazu geführt haben, dass mit Hilfe der CISH-Färbung weniger Zellen bei den HUVEC und in der Kokultur nachweisbar waren. Weiterführende Studien zur Charakterisierung von inter- und intrazellulärer Interaktion von HUVEC sind daher notwendig, um eine mögliche

Kokultivierung mit MSC zu optimieren. Dies wäre u. a. mit Hilfe von Bioreaktoren möglich (Schott et al. 2021; Kazimierczak und Przekora 2022). In diesem Modell kann eine später gewünschte In-vivo-Gewebepерfusion unter Berücksichtigung der gefäßspezifischen Hämodynamik in vitro nachgebildet werden (Motherwell et al. 2019). Der künstlich induzierte Durchfluss des Zellmediums aktiviert mittels Scherspannung die Zellproliferation und -differenzierung (Kazimierczak und Przekora 2022). Zudem können weitere Faktoren simuliert und angewendet werden, wie z. B. eine gefäßinduzierende Hypoxie (He et al. 2020). Solch präkonditionierte Träger können ein verbessertes angiogenes Potential zeigen (Han und Flynn 2020). Im Bereich der Osteogenese kann die Eigenschaft mesenchymaler Zellen, auf externe Stimuli zu reagieren, genutzt werden (Mobini et al. 2017; Kämmerer et al. 2020). So können niedrige Frequenzen (16 Hz) eine Osteogenese induzieren, wohingegen höhere Frequenzen (26 Hz) Osteoklasten aktivieren können (Ehnert et al. 2018). Bioreaktoren, die pulsierende elektromagnetische Felder erzeugen können, zeigen hier ein vielversprechendes Potential (Hamid et al. 2022; Kazimierczak und Przekora 2022).

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse von vorbesiedelten Kalziumkarbonatträgern mit HUVEC, MSC oder einer Kokultivierung (HUVEC und MSC) *in vivo*. Diese Träger wurden in immunsupprimierte RNU-Ratten implantiert, nach 14 Tagen und 28 Tagen explantiert und untersucht. Die verwendeten Methoden (qRT-PCR, Färbung mit PKH, Smith Karagianes, Osteopontin und In-situ-Hybridisierung) wurden gewählt, um die Entwicklung neuer Gefäße und die Mineralisation der Proben zu untersuchen und zu kontrollieren.

Mittels chromogener In-situ-Hybridisierung konnten die auf den Trägern vorbesiedelten humanen Zellen nach dem Versuchsablauf weiterhin nachgewiesen werden (CISH). In allen drei Gruppen (MSC, HUVEC, hMSC + HUVEC) wurden nach 14 und nach 28 Tagen sowohl eine gesteigerte Anzahl an neuen Gefäßen als auch eine erhöhte Mineralisation im Vergleich zur unbesiedelten Kontrollgruppe festgestellt.

Obwohl In-vitro-Studien bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten, zeigte die In-vivo-Kultivierung über einen längeren Beobachtungszeitraum (MSC + HUVEC) keine signifikante Verbesserung der Osteogenese und Angiogenese im Vergleich zu der monokulturellen Präkultivierung. Zukünftige In-vitro-Untersuchungen sollten den Einsatz von Kokulturen zur osteogenen und angiogenen Präkultivierung immer auch vor dem Hintergrund einer In-vivo-Anwendung untersuchen, um ein optimales Ergebnis zum Wohle des Patienten voranzutreiben.



## 6 Literaturverzeichnis

- Albrektsson T, Johansson C (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10, 96–101
- Alhadlaq A, Mao JJ (2004): Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13, 436–448
- Amoian B, Moudi E, Majidi MS, Ali Tabatabaei SM (2016): A histologic, histomorphometric, and radiographic comparison between two complexes of CenoBoen/CenoMembrane and Bio-Oss/Bio-Gide in lateral ridge augmentation: A clinical trial. *Dent Res J (Isfahan)* 13, 446–453
- Augustin HG (2016): Commentary on Folkman: “How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?”. *Cancer Res* 76, 2854–2856
- Bachman (2013): Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 530, 67–74
- Barabaschi GDG, Manoharan V, Li Q, Bertassoni LE (2015): Engineering pre-vascularized scaffolds for bone regeneration. *Adv Exp Med Biol* 881, 79–94
- Bayat H, Shahabinejad H, Bayat M, Shirian S, Mohamadnia A, Alijani M, Godarzi A, Shojaei P, Shojaei S, Shevidi A, Bahrami N (2019): Osteogenic differentiation of follicular stem cells on nano-Saghez scaffold containing BMP2. *J Orthop Surg Res* 14, 442
- Berendsen AD, Olsen BR (2015): Bone development. *Bone* 80, 14–18
- Bhamb N, Kanim LEA, Drapeau S, Mohan S, Vasquez E, Shimko D, McKAY W, Bae HW (2019): Comparative efficacy of commonly available human bone graft substitutes as tested for posterolateral fusion in an athymic rat model. *Int J Spine Surg* 13, 437
- Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, Soares R, Amédée J, Granja PL (2011): Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res* 7, 186–197
- Böhrnsen F, Schliephake H (2016): Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. *Int J Oral Sci* 8, 223–230
- Böhrnsen F, Lindner U, Meier M, Gadallah A, Schlenke P, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J (2009): Murine mesenchymal progenitor cells from different tissues differentiated via mesenchymal microspheres into the mesodermal direction. *BMC Cell Biol* 10, 92
- Böhrnsen F, Rotter N, Lindner U, Meier M, Wollenberg B, Rohwedel J, Kramer J (2012): Human mesenchymal stromal cells from adipose tissue of the neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269, 2561–2570
- Burg KJL, Porter S, Kellam JF (2000): Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21, 2347–2359
- Butler DL, Goldstein SA, Guilak F (2000): Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng* 122, 570–575

- Butler WT (1989): The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123–136
- Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G (2014): Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 25, 2445–2461
- Campbell JT, Kaplan FS (1992): The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 50, 283–289
- Caplan AI (2017): Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med* 6, 1445–1451
- Carmeliet P (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69, 4–10
- Carmeliet P, Jain RK (2011): Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307
- Carvalho MS, Silva JC, Cabral JMS, Silva CL da, Vashishth D (2019): Cultured cell-derived extracellular matrices to enhance the osteogenic differentiation and angiogenic properties of human mesenchymal stem/stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 13, 1544–1558
- Chen J, Deng L, Porter C, Alexander G, Patel D, Vines J, Zhang X, Chasteen-Boyd D, Sung HJ, Li YP et al. (2018): Angiogenic and osteogenic synergy of human mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells cocultured on a nanomatrix. *Sci Rep* 8, 15749
- Chen W, Liu X, Chen Q, Bao C, Zhao L, Zhu Z, Xu HHK (2018): Angiogenic and osteogenic regeneration in rats via calcium phosphate scaffold and endothelial cell co-culture with human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), human umbilical cord MSCs, human induced pluripotent stem cell-derived MSCs and human embryonic stem cell-derived MSCs. *J Tissue Eng Regen Med* 12, 191–203
- Chen X, Wang J, Yu L, Zhou J, Zheng D, Zhang B (2018): Effect of concentrated growth factor (CGF) on the promotion of osteogenesis in bone marrow stromal cells (BMSC) in vivo. *Sci Rep* 8, 5876
- Cheung AL (2007): Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Curr Protoc Microbiol* 4, A.4B.1-A.4B.8
- Chiesa I, De Maria C, Lapomarda A, Fortunato GM, Montemurro F, Di Gesù R, Tuan RS, Vozzi G, Gottardi R (2020): Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication* 12, 025013
- Ciceri P, Elli F, Cappelletti L, Tosi D, Savi F, Bulfamante G, Cozzolino M (2016): Osteonectin (SPARC) expression in vascular calcification: in vitro and ex vivo studies. *Calcif Tissue Int* 99, 472–480
- Corallini F, Celeghini C, Rimondi E, di Iasio MG, Gonelli A, Secchiero P, Zauli G (2011): Trail down-regulates the release of osteoprotegerin (OPG) by primary stromal cells. *J Cell Physiol* 226, 2279–2286

- Cornejo A, Sahar DE, Stephenson SM, Chang S, Nguyen S, Guda T, Wenke JC, Vasquez A, Michalek JE, Sharma R, et al. (2012): Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 18, 1552–1561
- Cornell CN (1999): Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 30, 591–598
- Correia C, Grayson WL, Park M, Hutton D, Zhou B, Guo XE, Niklason L, Sousa RA, Reis RL, Vunjak-Novakovic G (2011): In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One* 6, e28352
- Coury AJ (2016): Expediting the transition from replacement medicine to tissue engineering. *Regen Biomater* 3, 111–113
- De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, Peppas NA (2018): Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater* 5, 197–211
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM (1997): Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151, 671–677
- Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L (2002): Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng* 12, 15–35
- Deng Y, Jiang C, Li C, Li T, Peng M, Wang J, Dai K (2017): 3D printed scaffolds of calcium silicate-doped  $\beta$ -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation. *Sci Rep* 7, 5588
- Dennis SC, Berkland CJ, Bonewald LF, Detamore MS (2015): Endochondral ossification for enhancing bone regeneration: converging native extracellular matrix biomaterials and developmental engineering in vivo. *Tissue Eng Part B Rev* 21, 247–266
- Dias GJ, Mahoney P, Hung NA, Sharma LA, Kalita P, Smith RA, Kelly RJ, Ali A (2017): Osteoconduction in keratin–hydroxyapatite composite bone-graft substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105, 2034–2044
- Dömer P, Kayal J, Janssen-Bienhold U, Kewitz B, Kretschmer T, Heinen C (2021): Rapid and efficient immunomagnetic isolation of endothelial cells from human peripheral nerves. *Sci Rep* 11, 1951
- Donath K, Breuner G (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11, 318–326
- Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, De Calmanovici RW, Martin-Padura I, Breviario F, Garlanda C, Ramponi S, Mantovani A, Vecchi A (1997): A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1599–1604
- Echahdi H, El Hasbaoui B, El Khorassani M, Agadr A, Khattab M (2017): Von Willebrand's disease: case report and review of literature. *Pan Afr Med J* 27, 147

- Ehnert S, Van Griensven M, Unger M, Scheffler H, Falldorf K, Fentz A-K, Seeliger C, Schröter S, Nussler AK, Balmayor ER (2018): Co-culture with human osteoblasts and exposure to extremely low frequency pulsed electromagnetic fields improve osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 19, 994
- Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J, Perrier-Groult E, Aubert-Foucher E, Padeloup M, Auxenfans C, McGuckin C, Forraz N, et al. (2019): Characterization of different sources of human MSCs expanded in serum-free conditions with quantification of chondrogenic induction in 3D. *Stem Cells Int* 2019, 2186728
- Ferreira JJ, Zagalo CM, Oliveira ML, Correia AM, Reis AR (2014): Mandible reconstruction: History, state of the art and persistent problems. *Prosthet Orthot Int* 39, 182–189
- Fillingham Y, Jacobs J (2016): Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J* 98-B, 6–9
- Fu WL, Xiang Z, Huang FG, Gu ZP, Yu XX, Cen SQ, Zhong G, Duan X, Liu M (2014): Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone. *Tissue Eng Part A* 21, 948–959
- Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T, Inoue H, Ninomiya Y (2003): Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem* 133, 633–639
- Garcia P, Franz D, Raschke M (2014): Knochenersatzmaterialien—Grundlagen und klinischer Nutzen. *Z Orthop Unfall* 152, 152–160
- García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW (2015): Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 81, 112–121
- Giuliani A, Manescu A, Larsson E, Tromba G, Luongo G, Piattelli A, Mangano F, Iezzi G, Mangano C (2014): In vivo regenerative properties of coralline-derived (biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with Beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation x-ray microtomography. *Clin Implant Dent Relat Res* 16, 736–750
- Green DW, Lai WF, Jung HS (2014): Evolving marine biomimetics for regenerative dentistry. *Mar Drugs* 12, 2877–2912
- Habibovic P, Sees TM, Doel MA van den, Blitterswijk CA van, Groot K de (2006): Osteoinduction by biomaterials—physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 77, 747–762
- Hamid HA, Sarmadi VH, Prasad V, Ramasamy R, Miskon A (2022): Electromagnetic field exposure as a plausible approach to enhance the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells in clinically relevant scenarios. *J Zhejiang Univ Sci B* 23, 42–57
- Han TTY, Flynn LE (2020): Perfusion bioreactor culture of human adipose-derived stromal cells on decellularized adipose tissue scaffolds enhances in vivo adipose tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 14, 1827–1840

- Haubeck HD: Osteoprotegerin. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik (Springer Reference Medizin). Springer, Berlin, Heidelberg 2019, 1801
- He J, Decaris ML, Leach JK (2012): Bioceramic-mediated trophic factor secretion by mesenchymal stem cells enhances in vitro endothelial cell persistence and in vivo angiogenesis. *Tissue Eng Part A* 18, 1520–1528
- He X, Han Z, Jiang W, Huang F, Ren C, Wei Q, Zhou N (2020): Hypoxia improved vasculogenesis in distraction osteogenesis through Mesenchymal-Epithelial transition (MET), Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and autophagy. *Acta Histochem* 122, 151593
- Hill PA (1998): Bone remodelling. *Br J Orthod* 25, 101–107
- Hofmann A, Ritz U, Verrier S, Eglin D, Alini M, Fuchs S, Kirkpatrick CJ, Rommens PM (2008): The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials* 29, 4217–4226
- Holland PW, Harper SJ, McVey JH, Hogan BL (1987): In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>++</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 105, 473–482
- Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM (2002): Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 23, 4095–4103
- Holmes B, Bulusu K, Plesniak M, Zhang LG (2016): A synergistic approach to the design, fabrication and evaluation of 3D printed micro and nano featured scaffolds for vascularized bone tissue repair. *Nanotechnology* 27, 064001
- Hougen HP (1991): The athymic nude rat. Immunobiological characteristics with special reference to establishment of non-antigen-specific T-cell reactivity and induction of antigen-specific immunity. *APMIS Suppl* 21, 1–39
- Hristov M, Erl W, Weber PC (2003): Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1185–1189
- Hutchings G, Moncrieff L, Dompe C, Janowicz K, Sibiak R, Bryja A, Jankowski M, Mozdziak P, Bukowska D, Antosik P, et al. (2020): Bone regeneration, reconstruction, and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials. *J Clin Med* 9, 139
- Hutmacher DW (2001): Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed* 12, 107–124
- Iyyanar PPR, Thangaraj MP, Eames BF, Nazarali AJ (2019): Htra1 is a novel transcriptional target of RUNX2 that promotes osteogenic differentiation. *Cell Physiol Biochem* 53, 832–850
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745–2756

- Joensuu K, Uusitalo-Kylmä L, Hentunen TA, Heino TJ (2018): Angiogenic potential of human mesenchymal stromal cell and circulating mononuclear cell cocultures is reflected in the expression profiles of proangiogenic factors leading to endothelial cell and pericyte differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 12, 775–783
- Jordana F, Visage CL, Weiss P (2017): Bone substitutes. *Med Sci (Paris)* 33, 60–65
- Kämmerer PW, Engel V, Plocksties F, Jonitz-Heincke A, Timmermann D, Engel N, Frerich B, Bader R, Thiem DGE, Skorska A, et al. (2020): Continuous electrical stimulation affects initial growth and proliferation of adipose-derived stem cells. *Biomedicine* 8, 482
- Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y (2013): Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater* 9, 4906–4915
- Kazimierczak P, Przekora A (2022): Bioengineered living bone grafts—a concise review on bioreactors and production techniques in vitro. *Int J Mol Sci* 23, 1765
- Keane TJ, Badylak SF (2014): Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin Pediatr Surg* 23, 112–118
- Khan WS, Rayan F, Dhinsa BS, Marsh D (2012): An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? *Stem Cells Int* 2012, 236231
- Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Unger RE (2011): Co-culture systems for vascularization—learning from nature. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 291–299
- Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Dyszkiewicz-Konwińska M, Piotrowska-Kempisty H, Antosik P, Bukowska D, Bruska M, Izycki D, et al. (2019): Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) co-culture with osteogenic cells: from molecular communication to engineering prevascularised bone grafts. *J Clin Med* 8, 1602
- Koëter S, Tigchelaar SJ, Farla P, Driessen L, Kampen A van, Buma P (2009): Coralline hydroxyapatite is a suitable bone graft substitute in an intra-articular goat defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90, 116–122
- Komori T (2018): Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol* 149, 313–323
- Kramer J, Böhrnsen F, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J (2006): In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* 63, 616–626
- Kriegs JO, Churakov G, Jurka J, Brosius J, Schmitz J (2007): Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends Genet* 23, 158–161
- Kuss MA, Wu S, Wang Y, Untrauer JB, Li W, Lim JY, Duan B (2018): Prevascularization of 3D printed bone scaffolds by bioactive hydrogels and cell co-culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 106, 1788–1798
- Langer R, Vacanti JP (1993): Tissue engineering. *Science* 260, 920–926

- Langille BL, Adamson SL (1981): Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res* 48, 481–488
- Lee J, Lee S, Lee CY, Seo HH, Shin S, Choi JW, Kim SW, Park JC, Lim S, Hwang KC (2017): Adipose-derived stem cell-released osteoprotegerin protects cardiomyocytes from reactive oxygen species-induced cell death. *Stem Cell Res Ther* 8, 195
- Liang F, Leland H, Jedrzejewski B, Auslander A, Maniskas S, Swanson J, Urata M, Hammoudeh J, Magee W (2018): Alternatives to autologous bone graft in alveolar cleft reconstruction: the state of alveolar tissue engineering. *J Craniofac Surg* 29, 584–593
- Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF (2013): Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol* 28, 1109–1116
- Liu X, Chen W, Zhang C, Thein-Han W, Hu K, Reynolds MA, Bao C, Wang P, Zhao L, Xu HHK (2017): Co-seeding human endothelial cells with human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffold enhances osteogenesis and vascularization in rats. *Tissue Eng Part A* 23, 546–555
- Liu Y, Teoh SH, Chong MSK, Yeow CH, Kamm RD, Choolani M, Chan JKY (2013): Contrasting effects of vasculogenic induction upon biaxial bioreactor stimulation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells cocultures in three-dimensional scaffolds under in vitro and in vivo paradigms for vascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 19, 893–904
- Liu Y, Chan JKY, Teoh SH (2015): Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med* 9, 85–105
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402–408
- Ma J, Both SK, Ji W, Yang F, Prins HJ, Helder MN, Pan J, Cui FZ, Jansen JA, Beucken JJP van den (2014): Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as monocultures or cocultures with human umbilical vein endothelial cells: performance in vitro and in rat cranial defects. *J Biomed Mater Res A* 102, 1026–1036
- McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M (2009): Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis* 12, 35–46
- Mertz L (2013): What is biocompatibility?: a new definition based on the latest technology. *IEEE Pulse* 4, 14–15
- Meury T, Verrier S, Alini M (2006): Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 98, 992–1006
- Mobini S, Leppik L, Thottakkattumana Parameswaran V, Barker JH (2017): In vitro effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells. *PeerJ* 5, e2821
- Motherwell JM, Rozenblum M, Katakam PVG, Murfee WL (2019): Bioreactor system to perfuse mesentery microvascular networks and study flow effects during angiogenesis. *Tissue Eng Part C Methods* 25, 447–458

- Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT (2018): Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment? *J Orthop Trauma* 32, 7–11
- Noden DM (1989): Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 140, 1097–1103
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N (2014): Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9, 18
- Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, Carter ML, Pochampally R (2011): Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res* 6, 215–225
- Otto F, Kanegane H, Mundlos S (2002): Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 19, 209–216
- Pape HC, Evans A, Kobbe P (2010): Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma* 24, 36–40
- Peng Y, Sheng X, Xue F, Qian Y (2018): The genetic association between osteoprotegerin (OPG) gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) in postmenopausal women: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 97, e13507
- Percival CJ, Richtsmeier JT (2013): Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn* 242, 909–922
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, Pollak C de, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G (2000): Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18, 959–963
- Pirracco RP, Iwata T, Yoshida T, Marques AP, Yamato M, Reis RL, Okano T (2014): Endothelial cells enhance the in vivo bone-forming ability of osteogenic cell sheets. *Lab Invest* 94, 663–673
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147
- Pountos I, Giannoudis PV (2016): Is there a role of coral bone substitutes in bone repair? *Injury* 47, 2606–2613
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001): Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115, 186–194
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I (2013): The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 9, 1057–1069
- Randi AM, Smith KE, Castaman G (2018): von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood* 132, 132–140
- Rao RR, Peterson AW, Ceccarelli J, Putnam AJ, Stegemann JP (2012): Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis* 15, 253–264



- Ratajska A, Jankowska-Steifer E, Czarnowska E, Olkowski R, Gula G, Niderla-Bielińska J, Flaht-Zabost A, Jasińska A (2017): Vasculogenesis and its cellular therapeutic applications. *Cells Tissues Organs* 203, 141–152
- Ratner BD (2011): The biocompatibility manifesto: biocompatibility for the twenty-first century. *J Cardiovasc Transl Res* 4, 523–527
- Ren X, Wang Q, Liu C, Zhao Q, Zheng J, Tian K, Xu H, Mu Y (2021): Osteogenic ability using porous hydroxyapatite scaffold-based delivery of human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* 22, 1091
- Ribatti D (2004): The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 8, 294–300
- Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2019): The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. *Int J Mol Sci* 20, 705
- Rolstad B (2001): The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? *Immunol Rev* 184, 136–144
- Rosset EM, Bradshaw AD (2016): SPARC/Osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol* 52–54, 78–87
- Roux BM, Cheng MH, Brey EM (2015): Engineering clinically relevant volumes of vascularized bone. *J Cell Mol Med* 19, 903–914
- Rowold DJ, Herrera RJ (2000): Alu elements and the human genome. *Genetica* 108, 57–72
- Runyan CM, Gabrick KS (2017): Biology of bone formation, fracture healing, and distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg* 28, 1380–1389
- Sanan A, Haines SJ (1997): Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 40, 588–603
- Sanders R, Mayou BJ (1979): A new vascularized bone graft transferred by microvascular anastomosis as a free flap. *Br J Surg* 66, 787–788
- Santiago-Delpin EA (2004): The endothelium and early immune activation: new perspective and interactions. *Transplant Proc* 36, 1709–1713
- Schemitsch EH (2017): Size matters: defining critical in bone defect size! *J Orthop Trauma* 31, 20–22
- Schott NG, Friend NE, Stegemann JP (2021): Coupling osteogenesis and vasculogenesis in engineered orthopedic tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 27, 199–214
- Scotti C, Piccinini E, Takizawa H, Todorov A, Bourguine P, Papadimitropoulos A, Barbero A, Manz MG, Martin I (2013): Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3997–4002
- Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I (2012): Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant* 21, 1667–1677

- Sergeeva NS, Sviridova IK, Frank GA, Kirsanova VA, Akhmedova SA, Popov AA (2014): Criteria of biocompatibility of materials for bone defect repair. *Bull Exp Biol Med* 157, 689–694
- Shanbhag S, Pandis N, Mustafa K, Nyengaard JR, Stavropoulos A (2016): Cell cotransplantation strategies for vascularized craniofacial bone tissue engineering: a systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo studies. *Tissue Eng Part B Rev* 23, 101–117
- Smith LG, Karagianes MT (1974): Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcif Tissue Res* 14, 333–337
- Sobczak M, Dargatz J, Chrzanowska-Wodnicka M (2010): Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *J Vis Exp* 46, 2316
- Soost F (1996): Biocoral – ein alternativer Knochenersatz. *Chirurg* 67, 1193–1196
- Soost F, Reißhauer B, Herrmann A, Neumann HJ (1998): Natürliches korallines Kalziumkarbonat als alternativer Ersatz bei knöchernen Defekten des Schädels. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2, 96–100
- Sparks DS, Wagels M, Taylor GI (2018): Bone reconstruction: A history of vascularized bone transfer. *Microsurgery* 38, 7–13
- Steiner D, Lampert F, Stark GB, Finkenzeller G (2012): Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *J Orthop Res* 30, 1682–1689
- Tabata Y, Yoshino D, Funamoto K, Koens R, Kamm RD, Funamoto K (2019): Migration of vascular endothelial cells in monolayers under hypoxic exposure. *Integr Biol (Camb)* 11, 26–35
- Tamanini C, Ambrogi MD (2004): Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 39, 206–216
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, et al. (2009): TGF- $\beta$ 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 15, 757–765
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000): Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5, 40–46
- Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O’Doherty E, Lin Y, Friedrich CC, Daheron L, Lin CP, et al. (2010): Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3311–3316
- Usuda K, Iwai S, Funasaki A, Sekimura A, Motono N, Ueda Y, Shimazaki M, Uramoto H (2018): Expression and prognostic impact of VEGF, CD31 and  $\alpha$ SMA in resected primary lung cancers. *Anticancer Res* 38, 4057–4063
- van Gemert JTM, Abbink JH, van Es RJJ, Rosenberg AJWP, Koole R, Van Cann EM (2018): Early and late complications in the reconstructed mandible with free fibula flaps. *J Surg Oncol* 117, 773–780

- Walsh WR, Oliver RA, Christou C, Lovric V, Walsh ER, Prado GR, Haider T (2017): Critical size bone defect healing using collagen–calcium phosphate bone graft materials. *PLoS One* 12, e0168883
- Wang T, Nimkingratana P, Smith CA, Cheng A, Hardingham TE, Kimber SJ (2019): Enhanced chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 39, 101497
- Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646–656
- Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM (2012): The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 4, 64–68
- Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RGSV, Uth N (2015): Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review. *J Biomed Mater Res A* 103, 2460–2481
- Yukna RA, Yukna CN (1998): A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (BIOCORAL) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 25, 1036–1040
- Zaidi M (2007): Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13, 791–801
- Zannettino ACW, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, Gamble J, To LB, Findlay DM, Haynes DR (2005): Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 204, 714–723
- Zhang B, Zhang P, Wang Z, Lyu Z, Wu H (2017): Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. *J Zhejiang Univ Sci B* 18, 963–976
- Zhang S, Zhou M, Ye Z, Zhou Y, Tan WS (2017): Fabrication of viable and functional pre-vascularized modular bone tissues by coculturing MSCs and HUVECs on microcarriers in spinner flasks. *Biotechnol J* 12, 1700008
- Zhu H, Schulz J, Schliephake H (2010): Human bone marrow stroma stem cell distribution in calcium carbonate scaffolds using two different seeding methods. *Clin Oral Implants Res* 21, 182–188
- Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG (2008): Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1659–1663
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211–228