



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Einfluss der hypoxischen Konditionierung von peripheren
Blutzellen auf die parakrine Angiogeneseinduktion**

Katharina Kirchhoff

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Lars Maegdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arndt F. Schilling

2. Prof. Dr. Agnes Görlach

Die Dissertation wurde am 01.02.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.08.2021 angenommen.

„Es ist nicht genug zu wissen, man muss es auch anwenden;

Es ist nicht genug zu wollen, man muss es auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
II. Publikationen	VII
III. Einleitung	1
A. historischer Hintergrund der Eigenbluttherapie.....	1
B. Zusammensetzung von Platelet-rich Plasma (PRP) und heutige Anwendung.....	3
C. Angiogenese & Vasculogenese.....	8
C.1 Sprouting-Angiogenese.....	9
C.2 Non-Sprouting-Angiogenese	10
D. Hypoxia-inducible factor als Induktor der Angiogenese.....	11
E. Vorkommen der Angiogenese.....	13
F. Therapeutische Angiogenese.....	15
F.1 Angiogenese durch Präkonditionierung von Zellen.....	17
F.2 Angiogenese durch zellfreie Präkonditionierung.....	18
IV. Hypothesen	19
V. Material und Methoden	20
A. Aortic Ring Assay (ARA).....	20
A.1 Chirurgische Entnahme der Mauseaorta.....	20
A.2 Präparation der Mauseaorta.....	22
A.3 Kultivierung der Mauseaorta in Matrigel™	23
A.4 Mediumwechsel.....	25
B. Tube Formation Assay (TFA).....	25

Inhaltsverzeichnis

B.1 Herstellung Tube Formation Assays.....	25
B.1.1 Vorbereitung des Matrigels™ und der Slides.....	26
B.1.2 Vorbereitung der Zellen und der Medien.....	26
B.1.3 Assay Durchführung.....	27
B.1.4 Calcein-Färbung zur Auswertung durch ein Fluoreszenzmikroskop.....	27
C. Herstellung der Untersuchungsgruppen	28
C.1 Negativ-Kontrolle: PBS.....	28
C.2 Positiv-Kontrolle: VEGF.....	29
C.3 Plasma (EDTA).....	29
C.4 Hypoxia Preconditioned Plasma (HPP) (EDTA).....	29
C.5 Plasma Heparin ohne Zentrifugation.....	30
C.6 Hypoxia Preconditioned Plasma (HPP) (Heparin) 4 und 7 Tage inkubiert.....	30
C.7 Serum.....	31
C.8 Hypoxia Preconditioned Serum (HPS) 4 und 7 Tage inkubiert.....	31
C.9 Platelet-rich Plasma (PRP).....	31
C.9.1 Platelet-rich Plasma (PRP) aktiviert durch CaCl ₂	33
C.9.2 Platelet-rich Plasma (PRP) aktiviert durch Thrombin und CaCl ₂	33
C.10 Verdünnungsreihen von Blutprodukten.....	34
D. Auswertung	35
D.1 Mikroskopische Quantifizierung der Sprouting-Anzahl (ARA).....	35
D.2 Mikroskopische Quantifizierung der Tubes und Nodes (TFA).....	37
D.3 Übersicht der Auswertungen jeder Untersuchungsgruppe.....	38
E. Statistik.....	40
VI. Ergebnisse.....	41
A. Vergleich des Angiogenesepotentials unterschiedlicher Medien.....	41
B. Auswirkung der Inkubationszeit auf das Angiogenesepotential von hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten.....	48

Inhaltsverzeichnis

C. Auswirkung der Verdünnung von Blutprodukten auf das Angiogenesepotential.....	51
C.1 Angiogenese unter verdünntem Plasma.....	51
C.2 Angiogenese unter verdünntem HPP.....	55
C.3. Angiogenese unter verdünntem Serum.....	59
C.4 Angiogenese unter verdünntem HPS.....	63
C.5 Angiogenese unter verdünntem PRP + CaCl.....	68
C.6 Angiogenese unter verdünntem PRP + Thrombin + CaCl.....	70
VII. Diskussion.....	73
A. Material und Methoden.....	73
A.1 Aortic Ring Assay.....	75
A.2 Tube Formation Assay.....	77
B. Steigerung des angiogenen Potentials durch Hypoxie.....	80
C. Vergleich der Angiogeneseinduktion zwischen PRP und hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten.....	81
D. Steigerung der Angiogenese durch Verdünnung hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte.....	86
E. Limitationen.....	88
F. Ausblick.....	89
VIII. Zusammenfassung.....	90
IX. Literaturverzeichnis.....	92
X. Anhang.....	116
A. Abbildungsverzeichnis.....	116
B. Tabellenverzeichnis.....	118
XI. Danksagung.....	119

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ARA	Aortic Ring Assay
ASC	Adipose-derived Stem Cells
BCC	Blutzellkompartiment
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH-PAS	basic helix loop helix-Per/ARNT/Sim
BMI	Body-Mass-Index
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
CaCl ₂	Calciumchlorid
CLS	capillary-like structures
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Chelatbildner mit Metallkationen)
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC-CM	Endothelial Progenitor Cell-derived Conditioned Medium
EPO	Erythropoietin
FGF	Fibroblast Growth Factor
FIH	Factor inhibiting HIF
g	Gravitationsfeldstärke (ca. $9.81m/s^2$)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HPP	Hypoxia Preconditioned Plasma

I. Abkürzungsverzeichnis

HPS	Hypoxia Preconditioned Serum
HRE	Hypoxia-response Elements
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
hypB	hypoxisch präkonditionierten Blutprodukte
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-8	Interleukin 8
IU	Internationale Einheiten
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
neg.	negativ
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PDH	Prolyl Hydroxylase Domain Proteins
PF-4	Platelet Factor-4
PIGF	Placental Growth Factor
pos.	positiv
PRP	Platelet-rich Plasma
rpm	revolutions per minute
SEC	Serumkompartiment
Std.	Stunden
TFA	Tube Formation Assay

I. Abkürzungsverzeichnis

TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TSP-1	Thrombospindin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vHL	von-Hippel-Lindau-Protein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

II. Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht worden:

1. Moog P, **Kirchhoff K**, Bekeran S, Bauer AT, von Isenburg S, Dornseifer U, Machens HG, Schilling AF, Hadjipanayi E. *Comparative Evaluation of the Angiogenic Potential of Hypoxia Preconditioned Blood-Derived Secretomes and Platelet-Rich Plasma: An In Vitro Analysis*. **Biomedicines 2020**
2. Hadjipanayi E, Moog P, Bekeran S, **Kirchhoff K**, Berezhnoi A, Aguirre J, Bauer AT, Kükrek H, Schmauss D, Hopfner U, Isenburg S, Ntziachristos V, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF, Dornseifer U. *In Vitro Characterization of Hypoxia Preconditioned Serum (HPS)-Fibrin Hydrogels: Basis for an Injectable Biomimetic Tissue Regeneration Therapy*. **Journal of Functional Biomaterials 2019**
3. Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P, Bauer AT, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, **Kirchhoff K**, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF. *The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control*. **PLoS One 2015**

III. Einleitung

A. historischer Hintergrund der Eigenbluttherapie

Die Idee, unterschiedlichste Krankheitsbilder durch Entnahme und Rückführung autologer Blutbestandteile zu behandeln, ist weniger neu, als man zunächst denken mag.

Bereits im alten chinesischen Reich, etwa 200 Jahre v. Chr., galt Blut als der Inbegriff von Lebenskraft (Krebs, 2008; Paul U. Unschuld, 2011). So finden sich in der „Neiking“, einem Arzneibuch taoistischer Ärzte, Hinweise auf die Anwendung von Tier- und Menschenblut als Heilmittel bei diversen Erkrankungen (Paul U. Unschuld, 2011). Damalige Ärzte behandelten Infektionskrankheiten, Pneumonien, Inappetenz oder chronische Entzündungen durch Kneifmassagen oder das Einbringen multipler Nadelstiche (Paul U. Unschuld, 2011). Diese führten zu subkutanen Hämatomen, welchen eine heilende Wirkung nachgesprochen wurde (Paul U. Unschuld, 2011). Trotz dieses Jahrhunderte alten Erfahrungsschatzes sträubte man sich im europäischen Raum lange Zeit, die Methodik der Zurückinjektion zuvor entnommenen Blutes anzuwenden. Erst, als die Empirie durch naturwissenschaftlichen Hintergrund untermauert wurde, fand die Eigenbluttherapie ihren Platz in der ärztlichen Praxis (Krebs, 2008). Bahnbrechend war 1874 die erstmalig durchgeführte Autotransfusion durch William Highmore, der verblutenden Wöchnerinnen das bei der Geburt verlorene Blut rücktransfundierte und so die postpartale Mortalität senken konnte (Highmore, 1874). Eine der ersten Anwendungen der Eigenbluttherapie protokollierte 1876 Schede, der in der chirurgischen Wundversorgung wissentlich Blut in der Wunde des Patienten ließ, um den Heilverlauf zu begünstigen (Krebs, 2008; Uecker, 2016). Als eigentliche Entwickler der Eigenbluttherapie sind jedoch die beiden schwedischen Ärzte Grafstrom und Elfstrom zu nennen (Elfstrom, 1898). Zusammen injizierten sie 1898 mit Kochsalz verdünntes Vollblut zur Therapie von Pneumonien und Tuberkulose, mit dem Ziel der Freisetzung immunologisch wirksamer Stoffe (Elfstrom, 1898).

Im Jahr 1905 beobachtete August Bier schließlich, dass eine Fraktur durch ein Hämatom im Bereich des Bruchspaltes schneller heilt (Bier, 1905). Bei einem prolongierten Heilverlauf und der damit einhergehenden Gefahr einer Pseudarthrose injizierte Bier Eigenblut des Patienten in den Bruchspalt, um eine für

III. Einleitung

die Heilung nötige Entzündungsreaktion zu provozieren (Bier, 1905). Diese gut dokumentierte Methodik hatte auf dem Feld der Pseudarthrosebehandlung über Jahre Bestand (Uecker, 2016).

Im Jahr 1910 berichteten Linser und Mayer über erste Erfolge in der Behandlung der Schwangerschaftsdermatosen mittels Eigenblutseruminjektion. Zwei Jahre später empfahl Nowotny selbiges zur Therapie verschiedenster Infektionskrankheiten, vorzugsweise des Erysipels (Linser und Mayer, 1910; Mayer, 1911).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erschien eine Reihe wissenschaftlicher Veröffentlichungen, die sich mit dem Thema der Reizkörpertherapie auseinandersetzten (Krebs, 2008). Im Jahr 1912 festigte Schmidt durch seine Publikation „Über Arzneimittel der unspezifischen Proteinkörpertherapie“ das immunmodulatorische Wirkprinzip der Eigenbluttherapie auch wissenschaftlich (Schmidt, 1912). Drei Jahre später wurden zudem durch den Hautarzt Spiethoff Grundlagen der Eigenbluttherapie im dermatologischen Bereich geschaffen, die bis heute ihre Gültigkeit haben (Spiethoff, 1915). Es blieb nicht aus, dass diese Erkenntnisse auch auf wissenschaftlichen Kongressen Einzug hielten, wie z.B. auf dem 47. Chirurgenkongress 1923 (Krebs, 2008). In Abwandlung von beschriebenen Eigenbluttherapien fanden sich 1934 modifizierte Methoden unter dem Namen „Photobiologische Eigenbluttherapie“ (Krebs, 2008). Hierfür entnahm der tschechische Chirurg Hans Havlicek das venös Blut des Patienten in ein Citrat gefülltes Reagenzröhrchen und bestrahlte selbiges mit UV-C Licht, um es anschließend dem Patienten durch eine intramuskuläre Injektion zurückzuführen (Havlicek, 1934). Im Anschluss fügten Wehrli und Cassagrande 1925-1927 dem UV-bestrahlten Blut Sauerstoff hinzu und legten damit den Grundstein für die heutige hämatogene Oxidationstherapie, die dem Organismus zu einer vermehrten Sauerstoffverwertung verhelfen soll (Krebs, 2008; Uecker, 2016). Diesem Verfahren entlehnt, bestrahlte Forster in den 40er Jahren entnommenes peripheres Blut vor der Reinjektion mit Kurzwellen zur Behandlung von Allergien (Forster, 1942).

In den frühen 60er Jahren beschrieb der Tübinger Zahnchirurg Willi Schulte die Möglichkeit, Wunddefekte mithilfe autologen Eigenblutes zu therapieren (Schulte, 1960). Zu diesem Zweck wurde zunächst das bloße Eigenblut und einige Jahre später zentrifugiertes Eigenblut zur Defektfüllung nach der Entfernung ossärer Zysten im Kiefer verwendet (Schulte, 1960, 1964). Ziel war es hierbei, eine verminderte Koagelretraktion und eine dafür verstärkte Stabilisierung des Koagels zur

III. Einleitung

Infektionsreduktion zu erreichen (Schulte, 1969). Bis Mitte der 1990er Jahre stagnierte die Weiterentwicklung der Eigenbluttherapie. Erst im Jahr 1996 erlangten schließlich Yamamoto et al. Aufmerksamkeit durch die Verwendung von mit Thrombozyten angereichertem Plasma als Gewebekleberersatz zugunsten einer beschleunigten Blutstillung nach herzchirurgischen Eingriffen (K. Yamamoto, Hayashi, Miyamura, & Eguchi, 1996). Ein Jahr später wurde durch Whitman et al. erstmals ein Verfahren zur Herstellung von Platelet-rich Plasma (PRP) vorgestellt und 1998 anhand einer klinischen kieferchirurgischen Studie publiziert (Marx et al., 1998; Whitman & Berry, 1998). Bei PRP handelt es sich um ein autologes Blutprodukt, bei dem das Vollblut des Patienten zentrifugiert wird, um schlussendlich eine Plasma-Fraktion zu erhalten, die einen deutlich höheren Blutplättchengehalt (Thrombozytengehalt) aufweist, als zirkulierendes Blut (Ahmad et al., 2012). Die physiologische Konzentration von Blutplättchen beträgt bei einem Erwachsenen zwischen 150000 und 400000/ μl (Ahmad et al., 2012). Vergleicht man diese Werte mit denen des PRP, so findet sich im Platelet-rich Plasma eine etwa 8-mal so hohe Thrombozytenkonzentration (Eppley, Woodell, & Higgins, 2004).

B. Zusammensetzung von Platelet-rich Plasma und heutige Anwendung

Platelet-rich Plasma ist reich an parakrinen Proteinen, die nach Einbringung in den lebendigen Organismus in der Lage sind, dermale Fibroblasten und Endothelzellen zu stimulieren (Anitua, 1999; Anitua et al., 2004; Cervelli et al., 2009). In einer Wunde führt die Aktivierung von Thrombozyten zunächst zu der Ausbildung von Pseudopodien, anschließend zu der Formation eines Gerinnsels und letztendlich zur Degranulation der Blutplättchen (Sclafani, 2009). Durch die Degranulation der α -Granula der Thrombozyten werden Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), TGF- β (transforming growth factor beta), HGF (hepatocyte growth factor), PF-4 (platelet factor-4), Thrombospondin, Serotonin, Histamine und hydrolytische Enzyme frei (Chicharro-Alcántara et al., 2018; Hom, 2008; Lubkowska, Dolegowska, & Banfi, 2012; Sclafani, 2009; van den Dolder, Mooren, Vloon, Stoeltinga, & Jansen, 2006). Die folgende

III. Einleitung

Tabelle (Tab. 1) schlüsselt die genannten Faktoren gemäß ihrer Wirkung auf unterschiedliche Zellreihen auf.

Tab. 1: Übersicht ausgewählter, an der Angiogenese beteiligter Wachstumsfaktoren und ihrer Funktion; grün hinterlegt: pro-angiogene Faktoren, rot hinterlegt: anti-angiogene Faktoren

Wachstumsfaktor	Funktion
PDGF (platelet-derived growth factor)	Proliferation und Migration von Endothelzellen, proangiogen (Heldin & Westermarck, 1999), stimuliert die Kollagensynthese, die Kollagenaseaktivität, Chemotaxis von Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und glatten Muskelzellen, stimuliert die Wundkontraktion, Formation von Granulationsgewebe und Wund-Remodeling (Lynch, Nixon, Colvin, & Antoniades, 1987)
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Hauptinduktor der Angiogenese, stimuliert Endothelzellen (Hsu & Chang, 2004; Werner & Grose, 2003), Schlüsselregulator der physiologischen und pathologischen Vaskulogenese, Lymphangiogenese, Vasodilatation und der vaskulären Permeabilität (Tammela, Enholm, Alitalo, & Paavonen, 2005)
FGF (fibroblast growth factor)	stimuliert die Re-epithelisierung, Angiogenese, Formation von Granulationsgewebe, wirkt synergistisch mit VEGF (Xie et al., 2008), Proliferation von Fibroblasten,

III. Einleitung

	Kollagenakkumulation (Enoch, Grey, & Harding, 2006)
EGF (epidermal growth factor)	steuert die Proliferation, Differenzierung, Wachstum und Migration von Epithelzellen und Keratinozyten (Girdler, McGurk, Aqual, & Prince, 1995)
IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)	wirkt synergistisch mit PDGF und EGF auf die Migration von Keratinozyten und die Geweberegeneration / Epithelisierung (Greenhalgh, Hummel, Albertson, & Breeden, 1993; Haase, Evans, Pofahl, & Watt, 2003), Chemotaxis für Fibroblasten (Alsousou, Thompson, Hulley, Noble, & Willett, 2009; Molloy, Wang, & Murrell, 2003)
TGF- β (transforming growth factor beta)	steigert die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten, stimuliert Biosynthese von Kollagen und Fibronectin (Alsousou et al., 2009; Molloy et al., 2003), Abbau der extrazellulären Matrix, fördert die Wundkontraktion, Generation von Narbengewebe (Penn, Grobbelaar, & Rolfe, 2012)
HGF (hepatocyte growth factor)	reguliert Zellwachstum, Motilität und Morphogenese von Epithel- und Endothelzellen, Epithelregeneration, Formation von Granulationsgewebe und Neovaskularisation (Conway, Price, Harding, & Jiang, 2006), synergistischer Effekt zwischen HGF

III. Einleitung

	und VEGF triggert die angiogene Wirkung in der Wunde (Anitua et al., 2005)
PF-4 (Platelet factor-4)	negativer Regulator der Angiogenese und starker Inhibitor der Proliferation von Endothelzellen, Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten (Lord, Cheng, Farrugia, McCarthy, & Whitelock, 2017)
Thrombospondin-1	Stimuliert die Migration von glatten Muskelzellen, inhibiert die Migration von Endothelzellen, bindet TGF- β und PDGF (Lawler & Lawler, 2012)

Das Ziel der lokalen Verwendung von PRP ist die verlängerte Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten und die konsekutive langanhaltende Stimulation von Fibroblasten, welche zu einer verbesserten Wundheilung führen (Anitua et al., 2012; Leitner et al., 2006).

Über die Verwendung in der Wundheilung hinaus bestätigen einige Studien die klinische Wirksamkeit von PRP im Bereich der Hautalterung. Darin konnte gezeigt werden, dass PRP die Bioregeneration der Haut dadurch anregt, Fibroblasten zu stimulieren, anti-inflammatorische Faktoren nach oben zu regulieren und vermehrt angiogene Faktoren zu produzieren, welche die extrazelluläre Matrix gestalten (Kim et al., 2011). Weiterhin zeigten klinische Studien die effektive Anwendung von intrakutan appliziertem PRP zur Hautverjüngung im Gesichtsbereich. Hierbei konnte eine Faltenminderung durch Stärkung der altersbedingt nachlassenden Hautelastizität erzielt werden (Yuksel, Sahin, Aydin, Senturk, & Turanli, 2014). Wir konnten bestätigen, dass hypoxisch präkonditionierte Blutprodukte ähnliche Effekte zu erzielen vermögen. Eine Studie zu diesem Thema wurde von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Hadjipanayi et al., 2019).

III. Einleitung

Noch heute findet PRP vor allem in der Zahn-, Mund und Kieferchirurgie Anwendung (Cervelli et al., 2009). Zudem wird es aber auch in der Orthopädie zur Frakturheilung und bei der Behandlung diabetischer Wunden verwendet (Cervelli et al., 2009). Darüber hinaus wird es auch in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie zur Prophylaxe von Wundheilungsstörungen angewandt (Giordano et al., 1988; Klein et al., 2001; Smith, Binford, Holt, & Webb, 2007). In den letzten Jahren gelangte PRP vor allem in Nordamerika als intradermales Hautverjüngungsmittel in den Fokus der Öffentlichkeit (Sciafani, 2011). Unter dem Namen „Vampire Filler“ wird das autologe Blutprodukt als Alternative zu Botox® und Hyaluronsäure gehandelt.

Bis heute hat sich eine Vielzahl an unterschiedlichen Verfahren zur Produktion von PRP entwickelt. So stehen aktuell unterschiedliche Systeme zur Verfügung, die versprechen, anwenderfreundlich und binnen kürzester Zeit aus Vollblut PRP zu gewinnen. Beispiele für solche Kits sind Vivostat PRF Preparation Kit® (Vivolution A/S, Birkerød, Dänemark), PCCS Platelet Concentrate Collection System® (3i Implant Innovations Iberica S.I., Barcelona, Spanien), Harvest® SmartPREP 2 APC 60 Process Kit (Harvest Technologies, Plymouth, USA) und Fibrinet® Autologous Fibrin & Platelet System (Cascade Medical Enterprises Ltd, Plymouth, Großbritannien) (Leitner et al., 2006). Eine österreichische Studie von 2006 zeigte zwar, dass jedes dieser Systeme imstande ist, Wachstumsfaktoren freizusetzen, die jeweilige Zusammensetzung des PRP und vor allem der resultierende Gehalt an Thrombozyten differiert jedoch merklich (Leitner et al., 2006). Doch auch ohne ein kommerziell erworbenes PRP-Kit findet sich in der Literatur eine große Bandbreite an Herstellungsprotokollen, die eine allgemein gültige Bewertung der Zusammensetzung und Wirkungsweise von PRP unmöglich machen. Diese Heterogenität der Herstellungsprozesse erschwert es zudem, Studien miteinander zu vergleichen (Anitua, Sanchez, Orive, & Andia, 2008; Chahla et al., 2017). So wird die regenerative Kapazität von PRP durch qualitative und quantitative Unterschiede der Blutplättchen verändert (Weibrich, Kleis, Hitzler, & Hafner, 2005).

C. Angiogenese & Vasculogenese

Der Begriff der Angiogenese bezeichnet das Wachstum von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (Werner Risau, 1997). Dieser Vorgang ist von essentieller Bedeutung in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie z.B. dem Organwachstum, der Wundheilung oder der embryonalen und fetalen Entwicklung (P. Carmeliet, 2005; P. Carmeliet & Jain, 2011; Potente, Gerhardt, & Carmeliet, 2011). Blutgefäße, welche von Endothelzellen ausgekleidet sind, gewährleisten den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen an sämtliches Gewebe im Organismus, so unterstützen sie die Aufrechterhaltung des Immunsystems und den Abtransport von Abfallstoffen (Coultas, Chawengsaksophak, & Rossant, 2005). Im vollständig entwickelten Organismus gilt das kardiovaskuläre System schließlich auch als Teil eines systemischen „Informationssystems“, durch welches entfernte Organe und Gewebe über Botenstoffe und andere Moleküle in der Lage sind, miteinander zu kommunizieren (W. Risau & Flamme, 1995). In diesen entscheidenden Charakteristika liegt auch begründet, wieso das Netzwerk von Herz und Gefäßen das zuerst entwickelte Organsystem in der Embryonalentwicklung von Säugetieren ist (W. Risau & Flamme, 1995).

Die Angiogenese und ihre hochkomplexe Kaskade sind ein weites Feld in der Biologie und ein noch nicht vollständig entschlüsselter Gegenstand der Forschung (Baker et al., 2011; Liekens, De Clercq, & Neyts, 2001; Vailhe, Vittet, & Feige, 2001). Die Entdeckung verschiedenster pro- und antiangiogener Faktoren führte zu der Annahme der angiogenen Balance, laut welcher das Gefäßwachstum durch das Vorliegen beider antagonisierender Mechanismen gesteuert wird (Bussolino, Caccavari, Valdembri, & Serini, 2009; Napoleone Ferrara & Kerbel, 2005; Hodivala-Dilke, Reynolds, & Reynolds, 2003; Iruela-Arispe & Dvorak, 1997; Kuwano et al., 2001; Springer, 2006). Als Leitprotein der Angiogenese wird die Familie der VEGF (vascular endothelial growth factor) gesehen, die unterschiedliche Prozesse in Endothelzellen reguliert (Gerhardt et al., 2003).

An dieser Stelle muss zwangsläufig der Begriff der Angiogenese von der Vaskulogenese abgegrenzt werden. Letztere definiert sich über das Entstehen mesodermaler Vorläuferzellen, sogenannter „Angioblasten“, die wiederum primitive Blutgefäße und einen primären Gefäßplexus formen (W. Risau & Flamme, 1995). Dieser Gefäßplexus generiert wiederum neue Endothelzellen, welche als Kapillaren aus bestehenden Gefäßen aussprossen. Hierbei sind zwei Formen der Angiogenese

III. Einleitung

bekannt: Die Sprouting-Angiogenese und die Non-Sprouting Angiogenese (auch Intussception) (Werner Risau, 1997; Vailhe et al., 2001). Im Zuge der Angiogenese zur Erweiterung des Gefäßbettes, stellt Hypoxie einen entscheidenden Stimulus dar (P. Carmeliet, 2003). Zu Beginn werden die Zellen zwar durch Diffusion mit Sauerstoff versorgt, jedoch stößt diese Versorgungsform bei wachsendem Gewebe bald an ihre Grenzen (P. Carmeliet, 2003). An dieser Stelle wird das Gefäßwachstum mittels Hypoxie und durch Initiierung des Hypoxia-inducible transcription factor (HIF) getriggert (Fraisl, Mazzone, Schmidt, & Carmeliet, 2009; Majmundar, Wong, & Simon, 2010; Pugh & Ratcliffe, 2003).

HIF dient dabei der Hochregulation vieler angiogener Gene, von denen VEGF das wohl bedeutendste ist (N. Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Das Gefäßwachstum lässt sich in vier Phasen unterteilen: 1. Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) vor allem durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) ; 2. Zell-Migration; 3. Zell-Proliferation; 4. Strukturelle Reorganisation (W. Auerbach & Auerbach, 1994; Cockerill, Gamble, & Vadas, 1995; Goodwin, 2007). Welche Form der Angiogenese dominiert, wird vor allem durch die Anzahl der vorbestehenden Gefäße bestimmt (Werner Risau, 1997). Während in der Embryonalentwicklung die Formation von neuen Gefäßen durch sowohl Vaskulogenese, als auch Angiogenese vonstatten geht, kommt es im vollständig ausgebildeten Organismus nur noch unter bestimmten physiologischen Bedingungen zur Angiogenese (Vailhe et al., 2001). Sie findet beispielsweise im Endometrium des Uterus unter Einfluss des Östrogenspiegels, in der Plazenta während der Schwangerschaft und während der Wundheilung statt (Vailhe et al., 2001). Dies zeigt, dass Endothelzellen weiterhin eine hohe Plastizität aufweisen und auf angiogene Signale reagieren (Potente et al., 2011).

C.1 Sprouting Angiogenese

Der Vorgang der (Sprouting-) Angiogenese, welcher das Wachstum von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen bezeichnet, wurde erstmals 1977 von Ausprunk und Folkman beschrieben (Ribatti & Crivellato, 2012). Diese Form der Angiogenese beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Phasen - das Wachstum von Neovessels und ihre anschließende Stabilisierung (Vailhe et al., 2001). Initial löst sich die Basalmembran mitsamt der umgebenden interstitiellen Matrix des „Muttergefäßes“

III. Einleitung

durch u.a. Matrix-Metalloproteinasen auf (Werner Risau, 1997; Vailhe et al., 2001). Die entstandene Lücke wird nun von Endothelzellen gefüllt, welche entlang des Gefälles von Wachstumsfaktoren migrieren und proliferieren (Vailhe et al., 2001). Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um eine Gruppe von löslichen und diffundierenden Peptiden, welche Wachstum, Differenzierung, Proliferation und den Zellmetabolismus verschiedenster Zelltypen regulieren (Anitua, Alkhraisat, & Orive, 2012; Canalis, McCarthy, & Centrella, 1988). Neben dem Wachstumsfaktorgefälle dienen sowohl andere Endothelzellen, als auch kapillarähnliche Strukturen wie Fibroblasten den unreifen Endothelzellen als Leitstruktur (Nehls, Herrmann, & Huhnken, 1998). Anschließend reift das Endothel und die ausgesprossenen Zellen bilden ein Lumen (Vailhe et al., 2001). Die Stabilisierungsphase beendet die Endothelproliferation und umfasst einen Neuaufbau der zuvor zerstörten Basalmembran. Zudem erfolgt die funktionelle Kopplung der Endothelzellen durch Adhäsionsverbindungen, wie vascular endothelial cadherin (Dejana, 1996; Lampugnani et al., 1995), sowie eine Ummantelung mit Perizyten um das unreife Neovessel (Dejana, 1996; Vailhe et al., 2001). Diese abschließende Stabilisierung ist von ausgesprochener Bedeutung, da das Neovessel ohne sie unwillkürlich durch Apoptose zugrunde ginge (Benjamin, Hemo, & Keshet, 1998).

Beispielsweise ist die Sprouting Angiogenese die vorrangige Angiogeneseform in der embryonalen Anlage des Gehirns, welche keine Angioblasten beinhaltet (Aplin, Fogel, Zorzi, & Nicosia, 2008).

C.2 Non-Sprouting Angiogenese

Die Besonderheit der Non-Sprouting Angiogenese oder Intussusception ist die intravaskuläre Ausbildung sogenannter „Pillar“ (*engl.* „Pfeiler“), welche zylindrischen Mikrostrukturen entsprechen, die das Lumen von schon bestehenden kleinen Gefäßen und Kapillaren aufspannen (Mentzer & Konderding, 2014). Dies dient vor allem der Vergrößerung des kapillären Gefäßnetzwerkes (V. G. Djonov, Kurz, & Burri, 2002). Dieser Vorgang wurde erstmals im Jahre 1986 durch Caduff et. al. in Versuchen an Rattenlungen unter einem Elektronenmikroskop beschrieben (Caduff, Fischer, & Burri, 1986), obwohl ähnliche Prozesse bereits vorher notiert wurden (Appell, 1980).

Der Vorgang der Non-Sprouting Angiogenese folgt nach Djoniv at al. vier Phasen: 1. Vorwölbung gegenüberliegender Kapillarwände in Richtung Lumen und ein dadurch

III. Einleitung

entstehender Kontakt von Endothelzellen; 2. Reorganisation interzellulärer Kontakte und zentrale Perforation der endothelialen Doppelschicht; 3. Entstehung der interstitiellen Pillars durch eindringende Zellen (Myofibroblasten und Perizyten); 4. Größenzunahme der Pillars (V. Djonov, Schmid, Tschanz, & Burri, 2000; V. G. Djonov, Galli, & Burri, 2000; V. G. Djonov et al., 2002). Das Wachstum solcher Pillars ermöglicht eine Ökonomisierung des Blutflusses, beispielsweise 1) durch die Änderung eines Winkels, in welchem sich Gefäße an einer Bifurkation trennen (Ackermann, Tsuda, Secomb, Mentzer, & Konerding, 2013), 2) durch die Verdopplung bereits bestehender Blutgefäße (Mentzer & Konerding, 2014) oder 3) indem sie Mehrfachanlagen oder ineffiziente Gefäße eliminieren (Lee et al., 2011).

Im Wesentlichen unterscheidet sich diese Angiogeneseform von der Sprouting-Angiogenese durch die Aufrechterhaltung der Basalmembran (Mentzer & Konerding, 2014). Zudem scheinen Endothelzellproliferation und Endothelzellmigration nach abluminal hierbei nicht vonnöten zu sein (Mentzer & Konerding, 2014).

Die Non-Sprouting Angiogenese ist z.B. in der Lunge zu finden, welche vor allem endotheliale Vorläufer beinhaltet und ursprünglich mittels Vaskulogenese durchblutet wird (Aplin et al., 2008; Pardanaud, Yassine, & Dieterlen-Lievre, 1989). Trotz seines großen therapeutischen Potentials und der biologischen Bedeutung sind die Abläufe der Non-Sprouting Angiogenese nicht abschließend geklärt (Simons, 2005), nicht zuletzt auch deshalb, weil es kaum möglich ist, die intravaskulären Prozesse durch konventionelle Lichtmikroskopie nachzuvollziehen (Mentzer & Konerding, 2014). Dieser Unterschied gegenüber der Sprouting Angiogenese verdeutlicht, wieso in Modellen zumeist auf das Sprouting als Quantifizierung von Gefäßwachstum zurückgegriffen wird.

D. Hypoxia-inducible factor als Induktor der Angiogenese

Bereits im Jahr 1961 beobachtete Ashton am Modell retinaler Gefäße, dass sich ein geringer Sauerstoffpartialdruck in verletztem Gewebe, umgeben von vitalem Gewebe, günstig auf das Einsprossen neuer Blutgefäße auswirkt (Ashton, 1961). Einige Jahre später konnten Remensnyder und Majno durch ihre Versuche am Kremastermuskel der Ratte bestätigen, dass das Ausmaß der Revaskularisierung stark mit dem

III. Einleitung

hypoxischen Gradienten im Zentrum einer Wunde korreliert (Remensnyder & Majno, 1968).

Hypoxie bezeichnet einen Mangel an Sauerstoff (O_2) im Gewebe, der zu einem beeinträchtigendem Zellmetabolismus führt (Okazaki & Maltepe, 2006). Die Oxygenierung des Gewebes wird hierbei durch eine Balance zwischen Sauerstoffversorgung durch das Gefäßsystem und dem Bedarf durch metabolische Prozesse beherrscht (P. Carmeliet, 2005). Eine vaskuläre Dysfunktion durch Gefäßokklusion kann daher zu einer geminderten Sauerstoffversorgung führen und die Progredienz diabetischer Retinopathien, pAVK und ischämischer Herzkrankheiten steigern (P. Carmeliet, 2005).

Es ist hierbei wichtig, Hypoxie als relativ zu sehen, da die physiologische O_2 Konzentration zwischen den Gewebetypen stark variiert (Krock, Skuli, & Simon, 2011). So verfügt z.B. arterielles Blut über einen pO_2 von 14%, das Myokard hat einen pO_2 von 10% und die meisten anderen Gewebe im Körper weisen einen pO_2 von etwa 5% auf (Carreau, El Hafny-Rahbi, Matejuk, Grillon, & Kieda, 2011). Betrachtet man hingegen Knorpel, Knochenmark und Thymus, liegt der dortige pO_2 sogar unter 1% (Braun, Lanzen, Snyder, & Dewhirst, 2001; Parmar, Mauch, Vergilio, Sackstein, & Down, 2007; Stockwell, 1991). Diese Beobachtungen in der Literatur belegen, dass Hypoxie nicht zwangsläufig ein pathologischer Zustand sein muss, sondern sogar für zelluläre Mechanismen in Stammzellen und Vorläuferzellen eine wichtige Rolle spielt (Keith & Simon, 2007).

Den Ausschlag in der Induktion der Angiogenese gibt vor allem Hypoxie (P. Carmeliet, 2005; Hadjipanayi & Schilling, 2013).

Vermittelt durch einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck steuert die HIF Familie (hypoxia-inducible factor) die Regulation von Genen, die in den Zellmetabolismus, Angiogenese und Apoptose involviert sind (An et al., 1998; Bunn & Poyton, 1996; P. Carmeliet et al., 1998; G. L. Wang, Jiang, Rue, & Semenza, 1995). Das erste Gen, für das 1992 eine HIF Aktivität nachgewiesen werden konnte, war EPO (Erythropoietin), welches einen Anstieg der Erythrozyten Produktion vermittelt (Semenza & Wang, 1992). Heute weiß man, dass HIF neben der Erythropoese und Angiogenese die Glykolyse steuert und damit auf verschiedene Art die Energiehomöostase lenkt (Gregg L. Semenza, 2004).

HIF gehört zu der bHLH-PAS (basic helix loop helix-Per/ARNT/Sim) Proteinfamilie (Kewley, Whitelaw, & Chapman-Smith, 2004) und besteht als Heterodimer aus den

III. Einleitung

zwei Untereinheiten HIF-1 und der β -Untereinheit ARNT (Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Krock et al., 2011). Für HIF-1 sind die drei Sauerstoff-sensitiven Isoformen HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α bekannt (Berra, Ginouves, & Pouyssegur, 2006; Kaelin & Ratcliffe, 2008; Krock et al., 2011). Während HIF-1 α ubiquitär vorkommt, findet die HIF-2 α Expression in adulten Organismen nur in bestimmten Zelltypen, wie etwa Endothelzellen, Gliazellen, Kardiomyozyten, Pneumozyten oder Hepatozyten statt (Patel & Simon, 2008; G. L. Semenza, 2004).

Besonders HIF-1 α reguliert hierbei eine Vielzahl von Genen als Reaktion auf Sauerstoffmangel (G. L. Wang et al., 1995; G. L. Wang & Semenza, 1993). Da HIF-1 α nicht selbst in der Lage ist, Sauerstoffschwankungen zu detektieren, übernehmen PHD (Prolyl Hydroxylase Domain Proteins) und FIH (Factor inhibiting HIF) diese Aufgabe (Berra et al., 2006; Kaelin & Ratcliffe, 2008; Mahon, Hirota, & Semenza, 2001). Unter normoxischen Verhältnissen wird HIF-1 α via PHD durch Hydroxylierung in seiner Aktivität gedämpft (Appelhoff et al., 2004; LOGES, RONCAL, & CARMELIET, 2009; Maxwell et al., 1999). Die Hydroxylierung bewirkt eine Bindung von HIF-1 α an das von-Hippel-Lindau-Protein (vHL) (Krock et al., 2011). Dieses ist seinerseits ein U3 Ubiquitin Ligase Komplex und leitet den Abbau der HIF-1 α Untereinheit ein (Krock et al., 2011). Herrschen jedoch hypoxische Verhältnisse, werden dadurch PHD und FIH inhibiert (Krock et al., 2011). Die PDHs können HIF-1 α nun nicht mehr hydroxylieren, wodurch HIF-1 α an Hypoxia-response Elemente (HRE) bindet und die Transkription der HIF-Zielgene eingeleitet wird (Fong & Takeda, 2008; Kaelin & Ratcliffe, 2008; Semenza, 1998). Der HIF Komplex wird somit durch die Hypoxie stabilisiert und aktiviert die Transkription einer Reihe pro-angiogener Gene (Krock et al., 2011). Durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF werden somit, sei es direkt oder indirekt, angiogene Mediatoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Placental Growth Factor (PIGF), Platelet derived Growth Factor (PDGF), Angiopietin-2 und Matrix-Metalloproteinasen induziert (Kelly et al., 2003).

E. Vorkommen von Angiogenese

Das Wachstum von Blutgefäßen ist ein fragiles Konstrukt in einem komplexen Zusammenspiel von Angiogenese begünstigenden und inhibierenden Molekülen und

III. Einleitung

Zellen (Bussolino et al., 2009; Hodivala-Dilke et al., 2003; Springer, 2006). Kommt es zu einer Dysregulation der Angiogenese, begünstigt dies die Entstehung unterschiedlichster Krankheiten (P. Carmeliet, 2003).

Ein überschießendes Gefäßwachstum trägt beispielsweise maßgeblich zur Pathogenese von Retinopathien, Adipositas, metabolischen Erkrankungen oder chronischen Entzündungsreaktionen bei (Cao, 2014; P. Carmeliet & Collen, 1998). Eine Sonderstellung nimmt hierbei die Gefäßneubildung im Zuge der Wundheilung ein. Dabei durchdringen feine Neovessels das Fibrin-/ Fibronectin-reiche Koagel, sodass sich binnen weniger Tage ein mikrovaskuläres Netzwerk im Granulationsgewebe gebildet hat (De Rossi, Scotland, & Whiteford, 2013). Auch hierbei ist das Gleichgewicht der pro- und antiangiogenen Wachstumsfaktoren zugunsten der angiogenen Faktoren (z.B. VEGF, FGF und Angiopoetin) verschoben (De Rossi et al., 2013).

Andererseits kann eine verminderte Gefäßversorgung zu Gewebeischämie und Organversagen führen, wie es z.B. bei Myokardinfarkten, Schlaganfällen, Osteoporose, Präeklampsie oder neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist (P. Carmeliet, 2003; P. Carmeliet & Collen, 1998; Folkman, 2007). Durch Grundlagenforschung im Feld der Angiogenese konnten bereits wichtige Fortschritte im Hinblick auf Krankheiten wie Arteriosklerose, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und chronischen Wundheilungsstörungen erzielt werden (Wagoner LE, 2007).

Aktuell sind über 70 Krankheiten bekannt, an deren Entstehung eine abnorme Angiogenese beteiligt ist (P. Carmeliet, 2005). Die Liste wird fortlaufend erweitert (P. Carmeliet, 2003).

Als Folkman 1971 erkannte, dass überschießendes Gefäßwachstum eine der Grundvoraussetzungen für das Wachstum von Tumoren ist, bildete dies den Grundstein neuer Therapeutika mit dem Ziel der Gefäßinhibition (Folkman, 1971).

Tumore benötigen ein ständiges Gefäßwachstum, um an Größe zuzunehmen und einen Anschluss an das systemische Blut- und Lymphsystem, um Ableger zu streuen (Liekens et al., 2001).

Aktuell sind unterschiedlichste Therapeutika zugelassen, die entweder Fördernd oder Hemmend auf die Angiogenese wirken. Dabei dient z.B. der monoklonale anti-VEGF Antikörper Bevacizumab (*Avastin*®, Hersteller Roche) seit 2004 der Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms (Chamberlain, 2011). Drei Jahre später

III. Einleitung

folgte die Zulassung für die Glioblastom Therapie durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (Chamberlain, 2011). Heute wird Bevacizumab zur Behandlung verschiedenster Tumoren, wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Nierenzellkarzinom, metastasiertem Brustkrebs, sowie off-label zur Therapie der feuchten Makuladegeneration eingesetzt (Folkman, 2007; Potente et al., 2011).

Im Gegensatz dazu sind proangiogene Pharmazeutika Gegenstand der Forschung, wenn es um die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit geht, welche eine der Haupttodesursachen weltweit darstellen (Stegmann et al., 2000).

Ein besseres Verständnis der Abläufe einer physiologischen Angiogenese kann daher wegbereitend für neue Therapieansätze sein.

F. Therapeutische Angiogenese

In den vergangenen Jahren hat die Prävalenz chronischer Wunden insbesondere durch die demografische Entwicklung in der westlichen Welt stark zugenommen (Chicharro-Alcántara et al., 2018). Als Folge von chirurgischen Eingriffen, Verbrennungen, Infektionen, Druckulzera oder diabetischen und venösen Ulzera leiden weltweit Millionen von Menschen an akuten oder chronischen Gewebeschäden (Teng, Huang, & Zhang, 2014). Es wird angenommen, dass von den weltweit 150 Millionen Diabetikern bis zu 15% an Fußulzera leiden, die sich oft zu nicht heilenden Wunden entwickeln (Boulton, Vileikyte, Ragnarson-Tennvall, & Apelqvist, 2005). Dies hat nicht zuletzt eine große sozio-ökonomische Bedeutung, da in Europa fast 2% des jährlichen gesundheitspolitischen Budgets direkt oder indirekt für das Management chronischer Wunden aufgebracht werden (Posnett, Gottrup, Lundgren, & Saal, 2009). Dabei liegt die Erfolgsrate entsprechender Therapien bei schätzungsweise 50%. Diese müssen oftmals wiederholt werden, was die Behandlungskosten steigert (Kozlik & Wojcicki, 2014). Im Gebiet der regenerativen Medizin wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt, welche durch minimal invasive Prozeduren und Behandlungsstrategien bei Patienten zu einer verringerten Morbidität und einer gesteigerten Lebensqualität führen konnten.

III. Einleitung

Das Ziel der therapeutischen Angiogenese ist es hierbei, den Heilungs- und Regenerationsprozess von unzureichend vaskularisiertem Gewebe zu unterstützen. Die Behandlungsansätze konzentrierten sich dabei lange Zeit auf die Zufuhr isolierter, einzelner rekombinanter Wachstumsfaktoren, mit überschaubarem Erfolg in klinischen Studien (Cao, 2009; Peter Carmeliet, 2000; Ho, Abraham, Black, & Baker, 2006; LOGES et al., 2009; Maulik & Thirunavukkarasu, 2008; Simons, 2005). Dies führt die Komplexität des Gefäßwachstums vor Augen und zwingt Wissenschaftler weltweit dazu, ihren Forschungsansatz von der Nachahmung angiogener Prozesse zu ihrer Induktion hin zu verschieben (Hadjipanayi & Schilling, 2013).

Durch vorherige Versuche wurde bereits nachgewiesen, dass periphere Blutzellen (einschließlich Lymphozyten und Monozyten) unter dem Einfluss von Hypoxie/ Ischämie, Inflammation oder Ultraschall mit der Ausschüttung diverser angiogener Wachstumsfaktoren reagieren (Hadjipanayi et al., 2013). Diese waren u.a. VEGF (Burke et al., 2003; Griga, Gutzeit, Sommerkamp, & May, 1999; Kolar, Gaber, Perka, Duda, & Buttgerit, 2011; Lichtenauer et al., 2011; Panutsopulos et al., 2003; Reher, Doan, Bradnock, Meghji, & Harris, 1999), PDGF (Pang et al., 2008), bFGF (Lichtenauer et al., 2011; Panutsopulos et al., 2003), IL-8 (Kolar et al., 2011; Lichtenauer et al., 2011) und MMP-9 (Lichtenauer et al., 2011) und besaßen allesamt die Fähigkeit der Angiogeneseinduktion sowohl *in vitro* (Bouchentouf et al., 2010; Montesano, Mossaz, Ryser, Orci, & Vassalli, 1984) als auch *in vivo* (Iba et al., 2002; Kamihata et al., 2002; Kobayashi et al., 2002; Kubo et al., 2008; Leor et al., 2006; Li, Zhou, & Han, 2006). Aus diversen Patientenstudien ging außerdem hervor, dass die Autotransplantation peripherer Zellen aus dem Blut oder mesenchymaler Zellen des Knochenmarks imstande ist, die Perfusion kritisch ischämischer Extremitäten zu verstärken (Al-Khaldi, Al-Sabti, Galipeau, & Lachapelle, 2003; Amann, Luedemann, Ratei, & Schmidt-Lucke, 2009; Ozturk et al., 2012), die Herzfunktion nach stattgehabtem Herzinfarkt zu verbessern (Tatsumi et al., 2007) und den Heilungsprozess von Hautulzerationen und nach Verbrennungen voranzutreiben (Hadjipanayi & Schilling, 2014; Holzinger et al., 1994; Zulloff-Shani et al., 2004).

Aktuell bestehen unterschiedliche Ansätze für die therapeutische Angiogenese. Zum einen werden hierbei Stammzellen *in vitro* hypoxisch präkonditioniert und anschließend mit dem Ziel der Faktorfreesetzung *in vivo* implantiert (Kubo et al., 2009;

III. Einleitung

Kubo et al., 2008). Die zweite Möglichkeit ist, die angiogene Hypoxie-vermittelte Signalkaskade *in vivo* durch Gentherapie oder Pharmazeutika anzustoßen (Milkiewicz, Pugh, & Egginton, 2004; Siddiq, Aminova, & Ratan, 2007; Zou et al., 2011).

In der Literatur wurden bereits unterschiedliche Ansätze der Angiogeneseinduktion durch Hypoxieeinfluss auf Blutzellen beschrieben.

F.1 Angiogenese durch Präkonditionierung von Zellen

Die Forschungsgruppe um Masayuki Kubo veröffentlichte 2008 eine Studie, in der hypoxisch präkonditionierte periphere Blutzellen intramuskulär in die Hinterläufe von Mäusen injiziert wurden (Kubo et al., 2008). Schon 3 Tage nach der Injektion konnte eine signifikant höhere Überlebensrate der hypoxisch präkonditionierten Zellen gegenüber Normoxie-kultivierten Zellen detektiert werden (Kubo et al., 2008). Nach 28 Tagen konnten in der Hypoxie-Gruppe schließlich sogar eine höhere Dichte an Neovessels und eine signifikant gesteigerte Perfusion der Gefäße gemessen werden (Kubo et al., 2008). Die Ergebnisse der Studie legten damit nahe, dass hypoxische Präkonditionierung der peripheren Blutzellen ihr Überleben und ihre angiogene Potenz durch Resistenzmechanismen gegenüber oxidativem Stress steigert (Kubo et al., 2008).

Im Falle von hypoxisch präkonditionierten mesenchymalen Stammzellen wurde gezeigt, dass ihr Potenzial gesteigert werden konnte, beschädigtes Myokard nach einem Infarkt zu reparieren (X. Hu et al., 2008).

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2012 ließ erkennen, dass durch die Transplantation hypoxisch präkonditionierter mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks die Angiogenese und Neurogenese von Ratten angeregt wurde, welche einen zerebralen Insult erlitten hatten (Wei, Fraser, Lu, Hu, & Yu, 2012). Die Arbeitsgruppe um Wei zeigte damit erstmals das neurologische Regenerationspotential hypoxisch präkonditionierter Zellen (Wei et al., 2012).

Doch nicht nur Blutzellen, auch Fettzellen profitieren von der hypoxischen Vorbehandlung. So konnte gezeigt werden, dass die VEGF Ausschüttung hypoxisch präkonditionierter ASCs (adipose-derived stem cells) dramatisch anstieg und bei Injektion die 7-Tage Überlebensrate ischämischer Lappenplastiken an Ratten gesteigert wurde (Hollenbeck et al., 2012).

F.2 Angiogenese durch zellfreie Präkonditionierung

Eine weitere Möglichkeit der Angiogeneseinduktion ist es, die Zellen nicht direkt in das ischämische Gewebe zu transplantieren, sondern lediglich den Wachstumsfaktorreichen Überstand der hypoxisch präkonditionierten Zellkultur zu verwenden. Basierend auf diesem Ansatz publizierten Di Santo et al. 2009 eine Studie, in welcher sie durch das Medium endothelialer Vorläuferzellen (EPC-CM) die Apoptose reifer Endothelzellen inhibieren konnten (Di Santo et al., 2009). Die entsprechenden Vorläuferzellen wurden hierbei 72 Std. hypoxisch präkonditioniert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand weiter verarbeitet (Di Santo et al., 2009). Zusätzlich konnte im Ratten Aortic Ring Assay Angiogenese induziert werden. Nachdem die angiogene Wirkung in vitro bewiesen wurde, wurde der Effekt auch in vivo bestätigt. Im Tierversuch zeigte sich nach der intramuskulären Injektion des EPC-CM in chronisch ischämische Hinterläufe von Ratten ein signifikant gesteigerter Blutfluss und eine gesteigerte Muskelleistung (Di Santo et al., 2009). Die Angiogenese-response stand der EPC Transplantation in nichts nach (Di Santo et al., 2009).

In der Literatur sind bereits eine Vielzahl an Angiogeneseinduktoren beschrieben, von denen Blut jedoch nur eine Option darstellt. Dieses kann wiederum auf unterschiedliche Weise aufbereitet und in einzelne Zellgruppen unterteilt werden. Da bereits noch unbekannt ist, wie sich unterschiedliche hypoxisch aufbereitete Blutprodukte auf das Gefäßwachstum auswirken, bildete dies die Grundlage meiner Forschung.

IV. Hypothesen

Da temporäre Hypoxie einen Schlüsselreiz für die Angiogenese im Gewebe darstellt, wurde in peripher entnommenem Blut eine wundähnliche Hypoxie imitiert, um die Freisetzung einer Reihe pro- und anti-angiogener Signalmoleküle zu induzieren.

Dieser Ansatz befasst sich mit der Fragestellung, wie Blutprodukte hypoxisch aufbereitet werden müssen, um ein möglichst großes angiogenes Potential entfalten zu können.

Neben dem Vergleich von Modifikationsmöglichkeiten in der Aufbereitung von Blutprodukten stellt sich die Frage, welchen Einfluss z.B. Konzentration von parakrinen Proteinen oder die Veränderung des Herstellungsprozesses auf die Angiogenese in den Assays hat.

Hierzu wurden folgende Hypothesen aufgestellt und geprüft:

- Unterschiedliche Blutprodukte wirken sich unterschiedlich stark auf die Tube Formation und das Vessel Sprouting *in vitro* aus.
- Eine unterschiedliche Inkubationszeit von hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten (hypB) wirkt sich signifikant auf ihr angiogenes Potential aus.
- Die Konzentration von hypB hat Einfluss auf ihre angiogene Wirksamkeit.

V. Material und Methoden

Um das Angiogenesepotential unterschiedlicher Blutderivate miteinander *in vitro* zu vergleichen, wurden zweierlei Assays zur Bewertung des Vessel Sproutings und der Tube Formation verwendet.

A. Aortic Ring Assay (ARA)

Der Aortic Ring Assay (ARA) spiegelt den Vorgang des Vessel Sproutings wider. Es dient der in Matrigel™ gebettete Mäuseaortenring als Quelle der zur Angiogenese benötigten Zellen.

Hierbei handelt es sich um ein ex vivo Modell, das in der Literatur vielfach beschrieben ist, um Faktoren zu untersuchen, die sich begünstigend oder hemmend auf die Angiogenese auswirken (Aplin et al., 2008; Baker et al., 2011; Goodwin, 2007). Der ARA ist charakterisiert durch das Wachstum neuer Blutgefäße aus Segmenten einer Mäuseaorta.

In leichter Abweichung von beschriebenen Verfahren wurde die Methodik zum Zwecke dieser Arbeit angepasst.

A.1 Chirurgische Entnahme der Mauseaorta

Zur Durchführung des ARA wurden fünf männliche und weibliche Sentinel Mäuse im Alter von sechs Monaten bis einem Jahr verwendet. Bei Sentinel Tieren handelt es sich um Kontrolltiere, die dem Nachweis latent vorhandener Krankheitserreger in Zucht- und Kontrollpopulationen dienen (Lipman & Homberger, 2003).

Ihre Präparation erfolgte in steriler Umgebung und unter einer Sterilwerkbank mit Laminar Flow. Ein wichtiges Qualitätskriterium zur Durchführung des ARA war es, die Zeitspanne zwischen Tod der Mäuse und ihrer Präparation möglichst gering zu halten, damit der einsetzende Verwesungsprozess des Organismus das Sprouting nicht blockiert.

V. Material und Methoden

Die Sentinel Mäuse wurden durch qualifiziertes und lizenziertes Fachpersonal mittels Sevofluran Intoxikation getötet. Von der alternativen Tötung durch Genickbruch wird zu diesem Zweck abgeraten, da es hier oftmals zu Schäden an der Aorta kommt. Bezüglich dieser Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte eine Meldung an das Veterinäramt durch das Zuchtpersonal (§9 Absatz 1 TierSchG). Ein entsprechender Ethikantrag wurde unter der Referenznummer 497/16S bewilligt.

Nach gründlicher Reinigung der Sterilwerkbank und Vorbereiten des sterilen chirurgischen Materials wurde jede Maus für jeweils mindestens 2 min. in 70% Ethanol eingelegt.

Anschließend wurde das Tier in Rückenlage an allen 4 Extremitäten und dem Schwanz auf der Unterlage aufgespannt. Der Hautschnitt erfolgte mittels eines 15er Skalpells vom Kehlkopf nach kaudal bis zur Schwanzbasis. Durch stumpfe Präparation mit einer Schere wurde die Haut von der darunter liegenden Muskelschicht abgehoben und ebenfalls seitlich abgespannt. Anschließend wurde der Corpus erneut durch 70% Ethanol desinfiziert.

Im folgenden Schritt erfolgte ein erneuter Längsschnitt durch Eröffnung des Thorax und des Bauchraumes im Sinne einer Thorakotomie und Laparotomie.

Folgende Arbeitsschritte wurden zur präziseren Arbeit mithilfe einer Lupenbrille (2,5-fache Vergrößerung) und mikrochirurgischem Besteck durchgeführt.

Zur Darstellung der Aorta wurden sämtliche Darmanteile mit sterilen Wattestäbchen angehoben und sicher identifizierbare Organe entfernt. Bei diesen handelte es sich in erster Linie um Leber und Lungen, da eine Verletzung des Darmes eine unmittelbare Kontamination des Operationsgebietes zur Folge gehabt hätte.

Es folgte somit die Eröffnung des Retroperitonealraumes mit Sicht auf Aorta und Wirbelsäule. Eine einwandfreie Identifikation der Aorta bot hierbei der thorakale Arcus aortae und die kaudale Iliakalbifurkation. Erst nach Durchtrennung sämtlicher Aortenabgänge (Truncus coeliacus, Nierenarterien, Mesenterialgefäße) wurde die Aorta in ihrer Länge von kaudal an der Iliakalbifurkation nach kranial am Arcus aortae präpariert und abgelöst. Anschließend wurde die Aorta eines jeden Tieres in eine eigene mit opti-MEM® Reduced Serum (Life Technologies, Germany) gefüllte Petrischale gelegt. Dem opti-MEM® Reduced Serum war zusätzlich ein Antimykotikum und ein Antibiotikum (Streptomycin) zugesetzt.

A.2 Präparation der Mauseorta

Anschließend wurden die in den Petrischalen befindlichen Aorten mikrochirurgisch gesäubert und von Fettgewebe und bindegewebigen Anhängen gereinigt. Ebenso wurde versucht, möglichst schonend auch die Adventitia mit zu entfernen und als nächstes das Lumen zu spülen, sodass es einsehbar wurde.

Darauf folgend wurde die etwa 45 mm lange Aorta mithilfe einer mikrochirurgischen Schere in circa 1-2 mm breite Ringe geschnitten. Hierbei galt es zu beachten, dass die Ringe jeweils im rechten Winkel zur Gefäßwand abgeschnitten wurden. Auch sollte ihre Länge im Verhältnis von 1:1 zum Lumen stehen, da so gewährleistet werden kann, dass sich die Ringe plan auf das Matrigel™ (Corning™ Matrigel™ Basement Membrane Matrix High Concentration) setzen lassen und im späteren ARA eine Einsicht ins Lumen möglich ist. Es zeigte sich, dass bei zunehmender Länge der Ringe selbige schneller im Well kippen und eine Lumeneinsicht verhindern.

Während der Zerteilung der Aorta wurde versucht, selbige mittels einer mikrochirurgischen Schere in möglichst gleich lange Teile zu separieren. Mit zunehmender Größe des Ringes nähme auch die Fläche für potenziell aussprossende Gefäße zu, was wiederum die Vergleichbarkeit zwischen den Testmedien behindern würde. Um dem entgegenzusteuern, wurde daher der Einsatz einer Schablone auf Basis eines 3D-Ausdrucks getestet (siehe Abb. 1). Diese sollte die exakt gleiche Größe aller verwendeten Aortenringe ermöglichen. Bei der Verwendung der Schablone wurde jedoch deutlich, dass die Aorta beim Durchschneiden durch das Skalpell massiv in die Schnittfugen gepresst wurde, was zu einer inakzeptablen Verletzung der Gefäßintima und des Endothels führte. Zudem waren auch die resultierenden Schnittflächen weniger sauber als bei der Zerteilung mittels mikrochirurgischer Schere. In Anbetracht dieser gravierenden Schwächen des Systems, wurde auf die Schablone zugunsten der Präparation mittels Schere verzichtet.

V. Material und Methoden

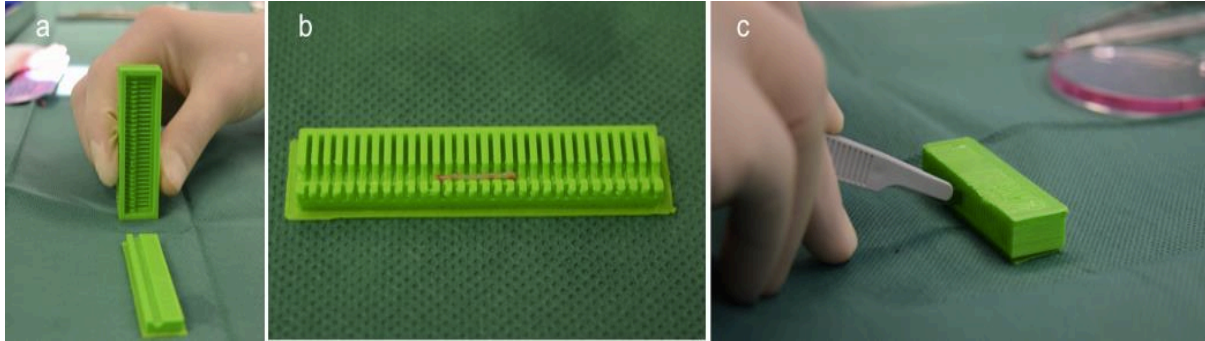


Abb. 1.a: zweiteilige Schablone aus 3D-Drucker, **b** Schablone mit einliegender Mäuseaorta, **c.** Gebrauch der Schablone

Optimalerweise ließen sich so aus einer Aorta bis zu 35 Ringe generieren.

Jeder Aortenring, welcher den Anforderungen genügte, wurde im nächsten Schritt in eine neue mit opti-MEM® Reduced Serum befüllte Petrischale transferiert. Es bot sich an, die Ringe eines Tieres jeweils in eine eigene Schale zu geben.

Die Petrischalen wurden im weiteren Verlauf bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Dieses Vorgehen diene der Serum Starvation mit dem Ziel, die basale Zellaktivität innerhalb der Aortenringe auf ein Minimum zu reduzieren und so eine uniforme Ausgangsposition zu schaffen (Baker et al., 2011).

A.3 Kultivierung der Mauseaorta in Matrigel™

Es erwies sich als vorteilhaft, die erste Schicht Matrigel™ (Corning™ Matrigel™ Basement Membrane Matrix High Concentration) mit je 50 µl pro Well, am Tag der Aortenpräparation durchzuführen. Die so gecoateten 96 Well Platten härteten unter denselben Bedingungen wie die Mäuseaorten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aus. Das Matrigel™ wurde hierzu bereits am Vortag über Nacht auf Eis lagernd aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:6 mit DMEM w/o Phenol (Life Technologies, Germany) gemischt. Zusätzlich wurde auch in diesem Schritt ein Antimykotikum und ein Antibiotikum (Streptomycin) hinzugegeben. Bei dem Verzicht auf Phenol red als Indikator im DMEM erwies sich die spätere Mikroskopie als deutlich vereinfacht und die daraus resultierenden Bilder als schärfer.

V. Material und Methoden

Um in jedem der Wells vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde die Platzierung der Aortenringe erneut mithilfe einer 2,5-fach vergrößernden Lupenbrille und mikrochirurgischem Besteck durchgeführt.

Dazu wurde das Lumen eines Aortenringes mit einer mikrochirurgischen Pinzette aufgenommen. Der jeweilige Ring wurde nun vorsichtig in das Zentrum des mit Matrigel™ gefüllten Well gesetzt, wobei dieser idealerweise auf dem viskösen Matrigel™ anheftete, sodass er sich leicht von der Pinzette abstreifen ließ.

Waren alle benötigten Ringe platziert, wurde sorgfältig noch einmal deren Position überprüft und ggf. korrigiert.

War dies geschehen, konnte mit dem Auftragen der zweiten Schicht Matrigel™ begonnen werden, welche 65 µl maß.

Jeder Ring lag folglich eingebettet zwischen einer unteren Schicht Matrigel™ mit 50 µl und einer oberen Schicht mit 65 µl.

Für den Versuch entscheidend ist hierbei, dass der Ring vollständig von dem, die extrazelluläre Matrix imitierenden, Matrigel™ umgeben ist und beim Auftragen des selbigen keine Luftblasen durch die Pipette eingebracht wurden.

Nun wurde ein Deckel auf die 96 Well Platte gesetzt und diese vorsichtig und horizontal gehalten in den Inkubator gesetzt. Hier härtete der Assay in den folgenden 6 Std. bei 37°C und 5% CO₂ aus.

War dies erfolgt, wurde auf jedes Well 150µl der jeweils zu testenden Kondition pipettiert. Dabei wurde die Pipettenspitze am Rand eines Wells angesetzt und die entsprechende Flüssigkeit an der Wand entlang laufend eingeflößt. Hierbei war aufgrund des geringen Durchmessers der einzelnen Wells ein Meniskusphänomen zu beobachten. Ein zentrales Eintropfen war hierbei aufgrund einer möglichen Beschädigung des Matrigels™ und des Aortenringes nicht anzuraten. Es wurden vier Ringe pro Kondition getestet und die Aorten wurden gleichmäßig auf die verschiedenen Medien aufgeteilt.

A.4 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel der einzelnen Konditionen wurde jeweils am 3. und am 5. Tag nach Ansetzen des Aortic Ring Assays vollzogen, um zu gewährleisten, dass der Gehalt an angiogenen Faktoren im Medium konstant bleibt.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 120 µl des alten Mediums entnommen und 150 µl des neuen Mediums hinzugefügt. Es wurde zugunsten der Intaktheit der Aortenringe und des Matrigels™ darauf verzichtet, die gesamte Menge des Mediums zu entnehmen.

B. Tube Formation Assay (TFA)

Die Durchführung eines Tube Formation Assays (TFA) wurde erstmals 1988 von Kubota et al. beschrieben, welche auf dem Prinzip basiert, dass Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, sich in Gegenwart angiogener Signale zu teilen und zu migrieren (Arnaoutova, George, Kleinman, & Benton, 2009; Kubota, Kleinman, Martin, & Lawley, 1988). Zudem sind diese Zellen weiter in der Lage, Tube-ähnliche Strukturen zu bilden und sich durch Schlussleistenkomplexe zu verbinden, wenn sie, wie hier gezeigt, auf einem Basalmembran Extrakt kultiviert werden (DeCicco-Skinner et al., 2014). Zur Darstellung der Tube Formation wurde hierbei auf humane Endothelzellen der Nabelschnurvene zurückgegriffen. Da sich diese Methodik durch ihre leichte und schnelle Anwendbarkeit auszeichnet und zudem noch preisgünstig ist, gilt sie auch 30 Jahre nach ihrer Entwicklung als der am häufigsten verwendete *in vitro* Angiogenese Assay (Arnaoutova et al., 2009).

B.1 Herstellung Tube Formation Assays

Für die Durchführung des TFA wurden ausschließlich µ-Slide Angiogenesis der Firma ibidi® verwendet. Die Assays wurden nach Herstellerempfehlung erstellt.

B.1.1 Vorbereitung des Matrigels™ und der Slides

Am Tag vor dem Einsetzen der HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurde das gefrorene Matrigel™ (Matrigel™ Growth Factor Reduced, Phenol Red-Free, Corning™) über Nacht auf Eis im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut. Pipettenspitzen, Pipetten und Angiogenese Slides wurden ebenfalls bei 4°C gekühlt. Das Experiment wurde unter einer Sterilwerkbank unter Laminar Flow durchgeführt.

Vor weiterer Durchführung des Experimentes wurden die Slides beschriftet (Name des Experimentes, Datum der Herstellung, Kürzel). Anschließend wurden die Slides auf Kühlakkus gesetzt und sofort 10 µl Matrigel™ in jedes der Wells appliziert. Dabei galt es zu beachten, dass die Pipettenspitze senkrecht und zentral über dem unteren Well gehalten wird, um den Kontakt des Matrigels™ zu dem oberen Well zu vermeiden. Auch galt es, das Matrigel™ langsam und ohne Einbringen von Luftblasen zu applizieren, da diese die Adhäsion und das Vernetzen der Zellen behindern. Zur Überprüfung der richtigen Menge an Matrigel™ pro Well wurde das Slide auf Millimeterpapier gesetzt und durch die gefüllten Wells gesehen. Bei korrektem Volumen an Gel bestand kein vergrößernder oder verkleinernder Effekt. Andernfalls musste das Volumen in den Wells angepasst werden. Für die Inkubation der Slides wurde eine Feuchtigkeitskammer vorbereitet, indem eine ausreichend große Petrischale mit wassergetränkten Papiertüchern ausgelegt worden ist. Das jeweilige Slide wurde mit dem Deckel wieder verschlossen und in der Feuchtigkeitskammer für 2 Std. bei 37°C inkubiert, um dadurch die Polymerisation des Matrigels™ zu bewirken.

B.1.2 Vorbereitung der Zellen und der Medien

Zur Präparation der Zellen wurden die HUVECs trypsinisiert, indem 3 ml Trypsin zu den Zellen gegeben und das Röhrchen 5 min. bei 20°C und 1200 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte das Auszählen der Zellen, um eine Zellsuspension von 1×10^6 Zellen /ml in AIM V als Trägermedium herstellen zu können.

Die zuvor vorbereiteten und bei -20°C gelagerten Medien wurden zudem bei 20°C aufgetaut und anschließend gründlich geschüttelt.

B.1.3 Assay Durchführung

Nach 2 Std. Inkubation konnten die Slides wieder unter der Sterilwerkbank platziert und geöffnet werden.

Anschließend wurden pro Well 10 μl Zellsuspension sowie 40 μl des zu testenden Mediums in das obere Well gegeben und diese mittels einer Multichannelpipette gut gemischt. Pro Medium wurden zwei Wells beimpft.

Danach konnte das richtige Volumen erneut mit Millimeterpapier überprüft werden.

Durch die plane Fläche am Boden der Wells verteilten sich die Zellen nach einigen Minuten gleichmäßig ohne Überlappungseffekt. Ein Meniskus entstand hierbei nicht.

Die Slides wurden nun für 16 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

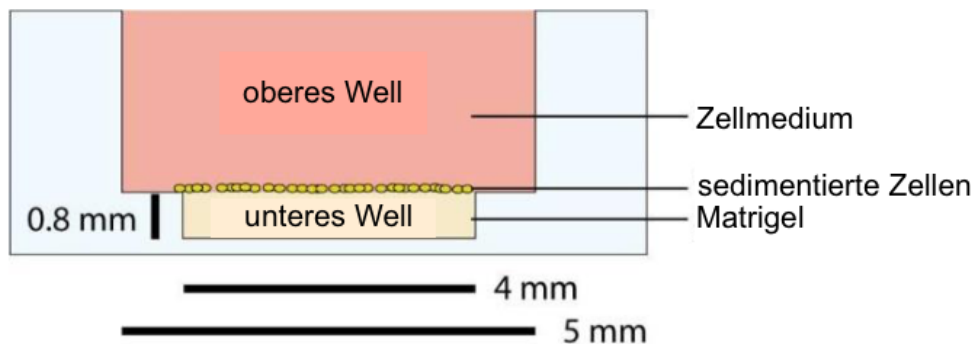


Abb. 2: Querschnitt eines μ -Slide Angiogenesis, mit freundlicher Genehmigung der ibidi GmbH, ibidi.com

B.1.4 Calcein-Färbung zur Auswertung durch ein Fluoreszenzmikroskop

Nach Beendigung der 16-stündigen Inkubation der Slides wurden zunächst die 40 μl Testmedium vorsichtig abpipettiert (Gefahr der Beschädigung des Gels oder Zellnetzwerkes).

Erst vor unmittelbarem Gebrauch wurde anschließend Calcein AM im Verhältnis 1:8000 in PBS (mit Ca²⁺/ Mg²⁺) verdünnt und möglichst unter Abschirmung von Licht 50 μl dieser Calcein AM Lösung in jedes Well gegeben. Hierbei galt es zu beachten, nicht direkt auf die Zellen zu pipettieren. Bei nicht Verwenden der Calcein AM Lösung wurde diese in Alufolie gewickelt, um eine Beeinflussung der Reaktion durch Licht zu vermeiden. Es folgte eine Inkubation der Slides im Dunkeln bei Raumtemperatur für 2

V. Material und Methoden

min. . Abschließend folgte das Abpipettieren der Calcein AM Lösung und die Wells wurden je 3-mal vorsichtig mit PBS gespült.

Nun waren die Wells bereit zur Bildanalyse durch ein Fluoreszenz Mikroskop unter 50- bzw. 100-facher Vergrößerung.

C. Herstellung der Untersuchungsgruppen

Für die Herstellung aller Untersuchungsgruppen, welche auf Blutprodukten aus peripheren Blutzellen basierten, wurde standardisiert wie folgt vorgegangen.

Bei den Blutspendern, welche der Blutspende schriftlich einwilligten, handelte es sich um je 2 weibliche und 2 männliche Probanden im Alter von 23 bis 27 Jahren mit einem BMI von 21 bis 23 kg/m². Sie alle waren Nichtraucher, nahmen keine blutverdünnenden Medikamente zu sich und litten unter keiner chronischen Erkrankung. Zur Gewinnung des venösen Blutes wurde immer eine Vene in der Ellenbeuge ausgewählt und die Haut entsprechend desinfiziert. Nach Ablauf der Desinfektionszeit erfolgte die Punktion der Vene (Blood Collection Set, Safety Lok, BD Vacutainer®, Dickinson and Company, USA) mit Aspiration in das jeweilige Blutröhrchen. Anschließend wurde die Nadel aus der peripheren Armvene entfernt und das Blutentnahmesystem in den dafür vorgesehenen Müll entsorgt. Abschließend wurde die Punktionsstelle mit Verbandsmaterial versorgt.

C.1 Negativ-Kontrolle: PBS

Als negativ-Kontrolle im Aortic Ring Assay und im Tube Formation Assay wurde das Medium PBS (PBS, Life Technologies, Germany) verwendet.

C.2 Positiv-Kontrolle: VEGF

Um die positiv-Kontrolle VEGF (Rekombinant Human VEGF 165) im Aortic Ring Assay und im Tube Formation Assay zu testen, wurde es in einer Konzentration von 90 ng/ml zu PBS gegeben.

C.3 Plasma (EDTA)

Die Standard Blutabnahme von 10 ml Blut erfolgte in einen EDTA Vacutainer® (BD Vacutainer® EDTA, 10 ml). Unmittelbar nach erfolgter Venenpunktion wurde das Röhrchen 8-10-mal Invertiert, um durch den EDTA Zusatz ein Gerinnen des Vollblutes zu verhindern. War dies geschehen, wurde der Vacutainer® für 10 min. bei 1200 rpm (\pm 274 g) und 22°C zentrifugiert. Anschließend wurde unter der Sterilwerkbank das Röhrchen geöffnet und das gelbe Plasma abpipettiert, dabei jedoch 0,5 cm Abstand zum buffy coat gehalten, um die Reinheit des Plasmas zu gewährleisten.

Das Plasma entspricht dem flüssigen Teil des Blutes ohne Blutzellen, jedoch mit darin gelösten Elektrolyten, Glukose, Harnstoff und Proteinen wie Albumin und den für die Gerinnung essentiellen Eiweißen Fibrin und Fibrinogen (Jan Behrends, 2012, pp. 166-180).

C.4 Hypoxia Preconditioned Plasma (HPP) (EDTA)

Die Standard Blutabnahme von 10 ml Blut erfolgte in einen EDTA Vacutainer® (BD Vacutainer® EDTA, 10 ml). Unmittelbar nach erfolgter Venenpunktion wurde das Röhrchen 8-10-mal Invertiert, um durch den EDTA Zusatz ein Gerinnen des Vollblutes zu verhindern. War dies geschehen, wurde die Verschlusskappe des Vacutainers® unter der Sterilwerkbank geöffnet und selbiger für 5 min. offen stehen gelassen. Anschließend wurde das Röhrchen mit Parafilm® luftdicht verschlossen und 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

Nach Beendigung der Inkubation konnte das überstehende HPP mit 0,5 cm Abstand zum buffy coat abpipettiert und ein neues Röhrchen transferiert werden.

C.5 Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation

Die Herstellung dieser Untersuchungsgruppe gestaltete sich bis zur Stempelentfernung der Omnifix® Spritze identisch zu C.4 .

Anschließend wurde das Heparin-Vollblut-Gemisch jedoch nicht in ein weiteres Gefäß transferiert, sondern die Spritze ohne Stempel aufrecht stehend unter der Sterilwerkbank belassen. Es wurde gewartet, bis nach etwa einer Stunde eine vollständige Sedimentation erreicht wurde.

Das gelblich überstehende Plasma konnte nun mit 0,5 cm Abstand zum buffy coat abpipettiert und in ein neues, steriles Röhrchen gefüllt werden.

C.6 Hypoxia Preconditioned Plasma (HPP) (Heparin) 4 und 7 Tage inkubiert

Vor der Blutabnahme wurde zunächst 1 ml Heparin (Heparin Medunasal 500 IU/ 5 ml) mit einer 2 ml Spritze (Injekt®Solo, B Braun) aufgezogen und über einen 3-Wege-Hahn in eine 10 ml Omnifix® Luer Spritze (B Braun) transferiert. In diese mit Heparin befüllte Omnifix® Spritze erfolgte die Aspiration während der Standard Blutabnahme. Hierbei galt es zu beachten, dass die Spritze nicht vollständig, sondern nur bis zur 10 ml Markierung befüllt wurde. Zwecks Gerinnungshemmung wurde die Spritze nun mit Hilfe eines Combi Stoppers (B Braun) verschlossen und vorsichtig 8-10-mal invertiert. Unter der Sterilwerkbank konnte der Stempel der Spritze nun vorsichtig entfernt werden und die Spritze wurde aufrecht für 5 min. offen stehen gelassen.

Anschließend wurde das Röhrchen mit Parafilm luftdicht verschlossen und, abhängig von der jeweilig herzustellenden Kondition, 4 Tage oder 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

Nach Beendigung der Inkubation konnte das überstehende HPP mit 0,5 cm Abstand zum buffy coat abpipettiert und ein neues Röhrchen transferiert werden.

C.7 Serum

Die Standard Blutabnahme erfolgte in eine 10 ml Omnifix® Luer Spritze (B Braun®). Nachdem die Spritzenöffnung mit einem Combi Stopper (B Braun®) verschlossen wurde, ließ man die Spritze aufrecht für 3 Std. unter der Sterilwerkbank stehen, um eine zuverlässige Separierung von Serum und Blutgerinnsel zu ermöglichen. War dies geschehen, konnte der Stempel der Spritze vorsichtig entfernt werden.

Das gelblich überstehende Serum konnte nun mit 0,5 cm Abstand zum Blutgerinnsel unter der Sterilwerkbank abpipettiert und in ein neues, steriles Röhrchen gefüllt werden.

Das Blutserum entspricht somit den flüssigen Blutbestandteilen (= dem Plasma), jedoch nach dem Entzug von Fibrin und Fibrinogen, welche Teil des Blutgerinnsels sind (Jan Behrends, 2012, pp. 166-180).

C.8 Hypoxia Preconditioned Serum (HPS) 4 und 7 Tage inkubiert

Die Standard Blutabnahme erfolgte in eine 10 ml Omnifix® Luer Spritze (B Braun®).

Nachdem die Spritzenöffnung mit einem Combi Stopper (B Braun) verschlossen wurde, wurde die Spritze aufrecht für 3 Std. unter der Sterilwerkbank stehen gelassen, um eine zuverlässige Separierung von Serum und Blutgerinnsel zu ermöglichen. War dies geschehen, wurde der Stempel der Spritze vorsichtig entfernt und die Spritze aufrecht für 5 min. offen stehen gelassen.

Anschließend wurde das Röhrchen mit Parafilm luftdicht verschlossen und, abhängig von der jeweilig herzustellenden Kondition, 4 Tage oder 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

Nach Beendigung der Inkubation konnte das überstehende HPS mit 0,5 cm Abstand zum Blutgerinnsel abpipettiert und ein neues Röhrchen transferiert werden.

C.9 Platelet-rich Plasma (PRP)

Die hier erfolgte Herstellung von PRP wurde in Anlehnung an die Anleitungen von Nagata (Nagata et al., 2010), Messora (Messora, 2011) und Amable (Amable et al.,

V. Material und Methoden

2013), die bereits unterschiedliche Herstellungsweisen von PRP beschrieben, durchgeführt.

Die Standard Blutabnahme von 6,5 ml Blut erfolgte zunächst in einen Citrat Vacutainer® (BD Vacutainer® Citrat, 6,5 ml).

Daran schloss sich die 1. Zentrifugation für 20 min. bei 1300 rpm (\cong 160 g) und 22°C an. Nach diesem Arbeitsschritt wurde im Röhrchen eine Schichtung in Blutzellkomponenten (BCC) und (im Überstand) Serum Komponenten (SEC) deutlich. Mittels Lineal wurde daraufhin 1,4 mm unter der Grenze zwischen BCC und SEC eine Markierung gesetzt.

Alles über dieser Markierung Befindliche wurde in ein neues Röhrchen ohne Antikoagulans gegeben. Es erfolgte im Anschluss die 2. Zentrifugation für 15 min. bei 1800 rpm (\cong 400 g) und 22°C. Durch diese 2. Zentrifugation ergab sich eine Schichtung in PRP und SEC im Überstand. Vom Boden des Röhrchens ausgehend wurde erneut eine Markierung bei 0,5 ml gesetzt. Alles unterhalb dieser Marke entsprach nun PRP.

Weitere in der Literatur beschriebene Variationen von Herstellungsprotokollen für PRP sind die Rotationsgeschwindigkeit bei der Zentrifugation, das Zeitfenster zwischen der PRP Aktivierung und der klinischen Anwendung und die Methode der Blutgewinnung (Dugrillon, Eichler, Kern, & Kluter, 2002; Efeoglu, Akcay, & Erturk, 2004; Marx, 2004). Des Weiteren besteht Uneinigkeit darüber, ob Leukozyten Bestandteil der PRP Zusammensetzung sein sollten. Die Arbeitsgruppe um Anitua sprach sich 2004 in dieser Frage gegen die Integration von Leukozyten aus, da diese in der Lage seien, die Funktion bestimmter Wachstumsfaktoren zu beeinflussen und mit anti-inflammatorischen und katabolen Vorgängen interagieren würden (Anitua, Andia, Ardanza, Nurden, & Nurden, 2004). Es wurde die Meinung einiger anderer Autoren vertreten, laut welcher die Präsenz von Leukozyten in der klinischen Anwendung einen antimikrobiellen Effekt unterstützen kann und somit hilft, das angiogene Potenzial des PRP zu entfalten (Trowbridge et al., 2005). Weitere Recherchen im Bereich der Publikationen zeigen, dass hohe Leukozyten- und Plättchenkonzentrationen im PRP mit einem ebenso steigenden Gehalt an Wachstumsfaktoren korrelieren (Oudelaar, Peerbooms, Huis in 't Veld, & Vochteloo, 2019). Unklar ist jedoch weiterhin, wie sich eine ideale Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren für die Angiogenese und das Gewebewachstum gestalten müsste (Oudelaar et al., 2019).

C.9.1 Platelet-rich Plasma (PRP) aktiviert durch CaCl_2

Die Aktivierung des in C.10. entstandenen PRP (0,5 ml) erfolgte für diese Kondition durch Zugabe von 0,5 ml CaCl_2 ($\cong 3,4 \text{ mg/ml} \cong 23 \text{ mM}$). Das PRP- CaCl_2 -Gemisch wurde nun für 30 min. bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator bebrütet. Nach diesem Schritt erfolgte die nun 3. Zentrifugation für 20 min. bei 1800 rpm (= 400 g) und 22°C . Danach konnten 0,5 ml zellfreier Überstand abpipettiert werden. Das nun durch CaCl_2 aktivierte PRP war bereit zur Testung.

C.9.2 Platelet-rich Plasma (PRP) aktiviert durch Thrombin und CaCl_2

Die Aktivierung des generierten PRP (0,5 ml) erfolgte für diese Kondition durch Zugabe von Thrombin mit CaCl_2 .

Dafür wurde die Thrombin-Lösung des Zweikomponenten-Gewebeklebers Tisseel® 2 ml (Baxter AG) verwendet. Von der Thrombin-Lösung wurden 0,05 ml mit 25 ml CaCl_2 -Lösung (1,5 mg/ml) gründlich vermischt. Die Lösung wurde im Anschluss für 30 min. bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator bebrütet. Nach diesem Schritt erfolgte die nun 3. Zentrifugation für 20 min. bei 1800 rpm ($\cong 400\text{g}$) und 22°C . Danach konnten 0,5 ml zellfreier Überstand abpipettiert werden. Das nun durch Thrombin und CaCl_2 aktivierte PRP war bereit zur Testung.

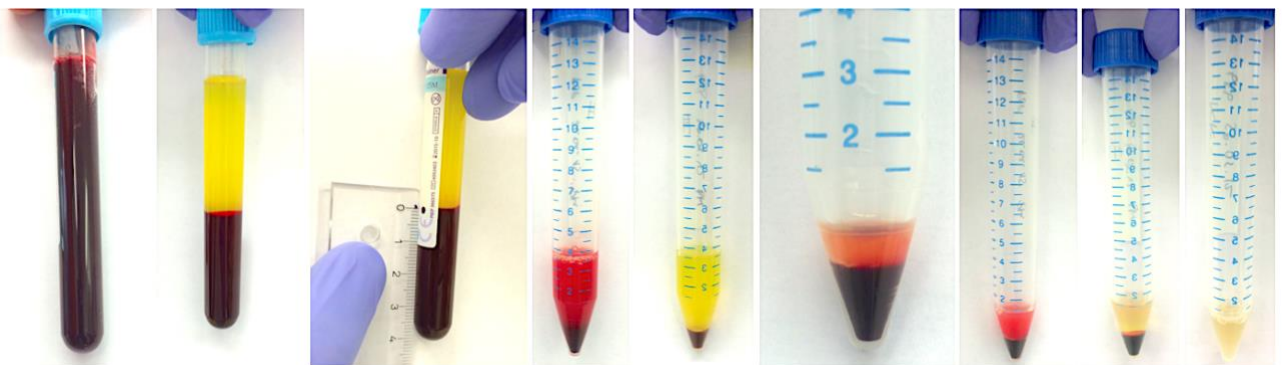


Abb. 3: PRP Herstellung v.l.n.r.: Nach Vollblutentnahme, nach 1. Zentrifugation, Markierung 1,4mm unter Grenze BCC zu SEC, Überstand in neuem Röhrchen, nach 2. Zentrifugation, nach Abpipettieren bis auf 0,5ml, nach Zugabe von Aktivierungssubstanz, nach 3. Zentrifugation, Endprodukt PRP nach Aktivierung

C.10 Verdünnungsreihen von Blutprodukten

Um den Effekt von Verdünnungen spezieller Blutprodukte auf ihr angiogenes Potential zu testen, wurden zunächst folgende Konditionen hergestellt:

- Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation (siehe C.5)
- HPP (Heparin), 4 Tage inkubiert (siehe C.6)
- Serum (siehe C.7)
- HPS, 4 Tage inkubiert (siehe C.8)
- PRP + CaCl (siehe C.9.1)
- PRP + Thrombin + CaCl (siehe C.9.2)

Die bislang unveränderten Medien wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung jeweils in folgenden Verhältnissen mit PBS verdünnt:

- unverdünnt
- 1:1
- 1:2
- 1:5
- 1:10
- 1:50
- 1:100
- 1:500 (ausgenommen PRP + CaCl und PRP + Thrombin + CaCl)
- 1:1000 (ausgenommen PRP + CaCl und PRP + Thrombin + CaCl)

Anschließend wurden die Verdünnungen 10-mal zum Durchmischen invertiert und waren anschließend bereit zum Gebrauch.

D. Auswertung

D.1 Mikroskopische Quantifizierung der Sprouting-Anzahl (ARA)

Nach dem Ansetzen des Aortic Ring Assays wurde die 96-Well Platte wie beschrieben zunächst über Nacht und ohne Berührung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass das Matrigel™ vollständig aushärten konnte. War dies geschehen, fand am ersten Tag nach ARA-Herstellung eine erste Kontrollmikroskopie am Zeiss-Mikroskop statt. Weitere Kontrollen mit Bilddokumentationen folgten am dritten, fünften und achten Tag. Dazu wurde jeder Aortenring nach einem festen Schema mikroskopisch vergrößert fotografiert. Dieses Vorgehen sah vor, zunächst eine Übersichtsaufnahme des jeweiligen Ringes in 100-facher Vergrößerung vorzunehmen. Zusätzlich wurde der Ring in die Quadranten Q1 - Q4 (s. Abb. 4) unterteilt und jeder Quadrant in 200-facher Vergrößerung bildlich dokumentiert. Abschließend folgte ein Bild des Lumens (s. Abb. 4, „L“).

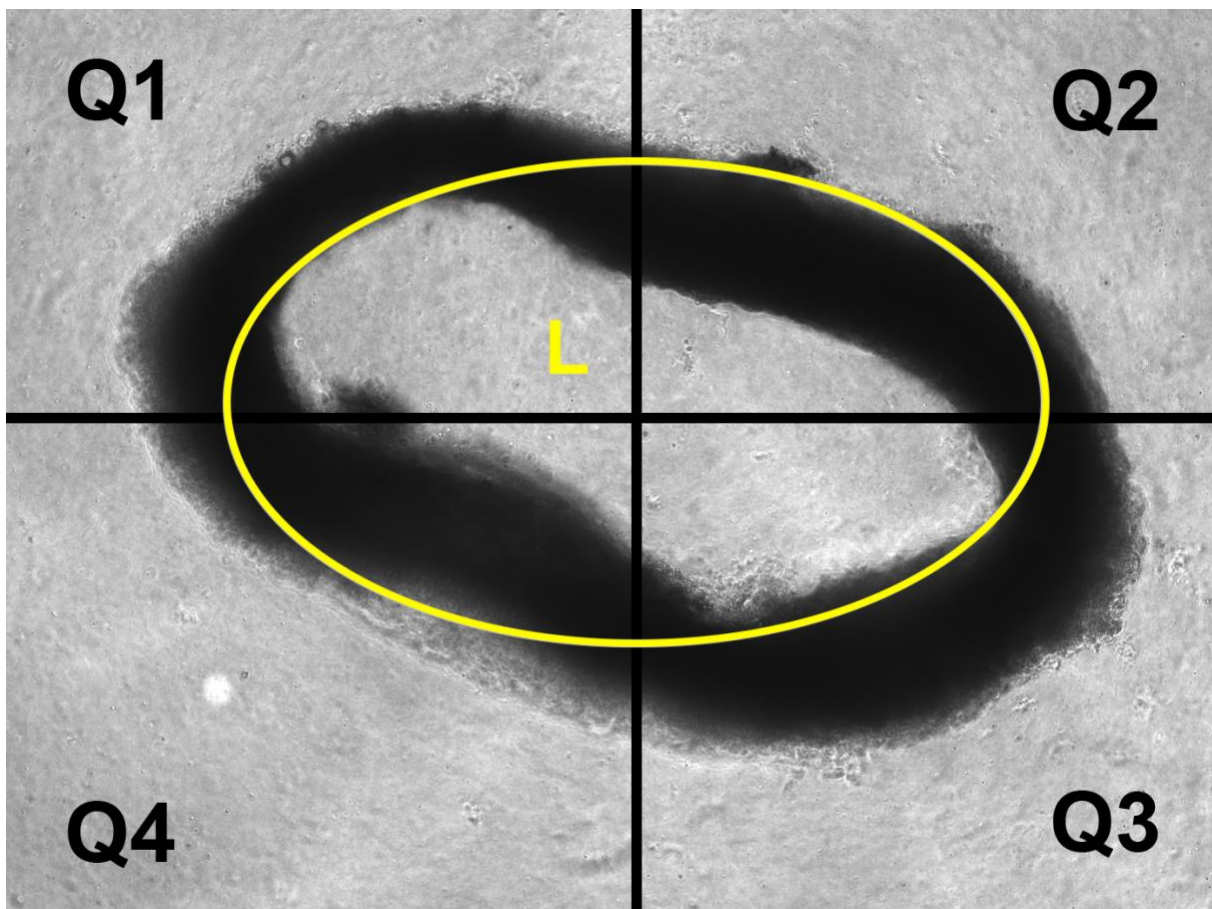


Abb.4: Gedachte Einteilung des Aortenringes bei der Mikroskopie und Auswertung

V. Material und Methoden

Bei der Bilddokumentation stellte sich die Dreidimensionalität des Ringes als Schwierigkeit dar, sodass oft mehrere Ebenen eingestellt werden mussten, um zu gewährleisten, dass jedes ausgesprossene Gefäß erfasst wurde. Im Zuge der Mikroskopie wurde die 96-Well Platte alle 45 min. bei 37°C und 5% CO₂ für 10 min. zwischenzeitlich inkubiert, um den Sprouting-Prozess nicht zu gefährden. Anschließend konnte die Mikroskopie fortgeführt werden.

Bei der Auszählung der Gefäße wurde ein solches gewertet, wenn es entweder direkt Kontakt zum Aortenring hatte oder aus einem Gefäß hervorging, das einen solchen besaß (s. Abb. 5).

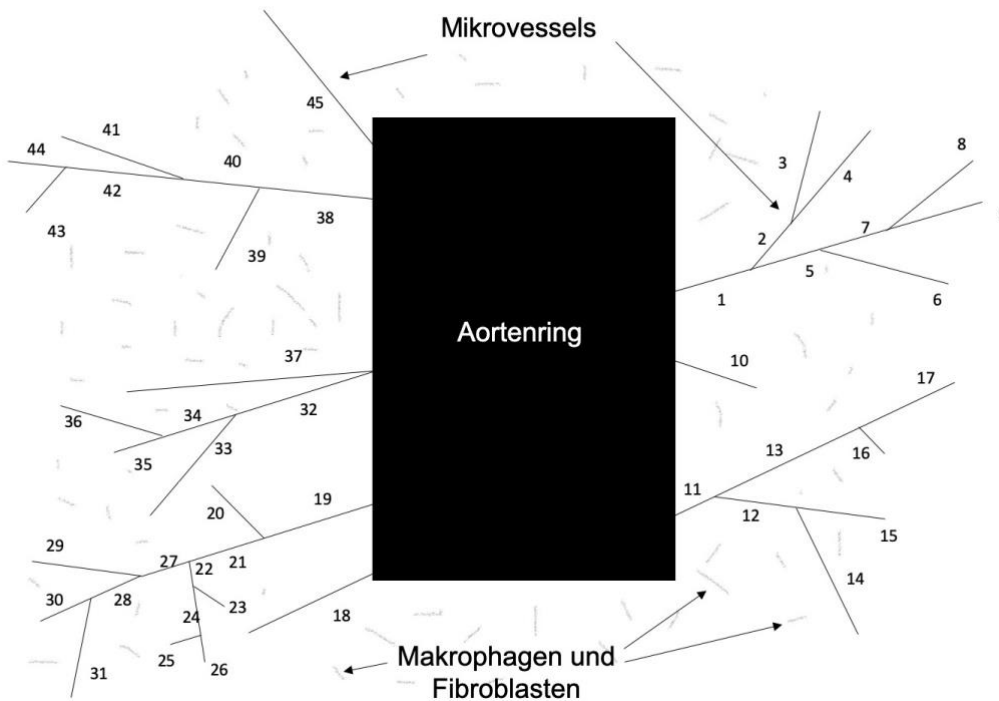


Abb.5: Visuelle Quantifizierung der Angiogenese im ARA. Gezeigt ist ein schematischer vertikaler Querschnitt durch das Well. Die ausgesprossenen Neovessels werden wie gezeigt gezählt.

Im Gegensatz zu solch regelrechten Neovessels wurden Strukturen wie proliferierende Fibroblasten nicht in die Wertung eingeschlossen.

Diese ähnelten zwar auf den ersten Blick den Neovessels, wiesen jedoch eine erhöhte Transparenz auf und neigten dazu, sich weiter in die Peripherie auszubreiten (s. Abb. 6.b).

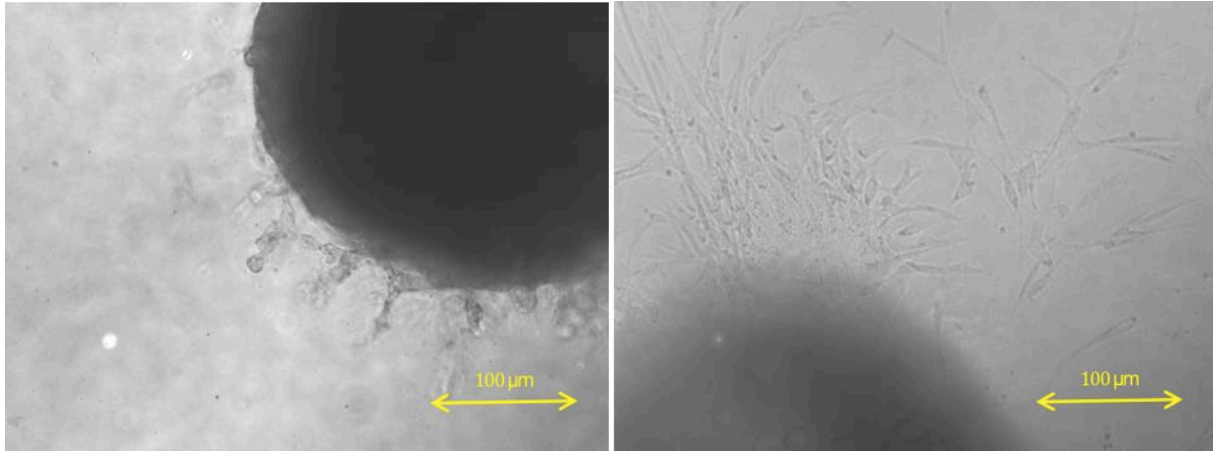


Abb. 6.a.: *Regelrechte Neovessels am Beispiel der Untersuchungsgruppe Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation in 200-facher Vergrößerung, b. Nicht gewertete Strukturen aus migrierten Fibroblasten der Untersuchungsgruppe PRP aktiviert durch Thrombin*

D.2 Mikroskopische Quantifizierung der Tubes und Nodes (TFA)

Nachdem die μ -Slides für 16 Std. inkubiert wurden (s. B.1.3.) und mittels Calcein AM gefärbt wurden (s. B.1.4), fand eine Fluoreszenzmikroskopie am Zeiss-Mikroskop statt. Hierzu wurden Tubes und Nodes des jeweiligen Wells in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurde das Well, analog zur ARA Auswertung in D.1, in Quadranten aufgeteilt, diese jeweils fotografiert und abschließend das Zentrum des Wells erfasst, da hier kein Lumen vorlag.

Aufgrund der planen Auflagefläche der HUVECs auf dem Matrigel™ fand die Darstellung des Assays in nur einer Ebene statt, was dessen Auswertung leichter gestaltete, als die des ARAs.

Ein Tube entsprach einem Gefäß zwischen zwei Nodes.

Ein Node wiederum stellte die Verbindung zwischen zwei oder mehr Tubes dar.

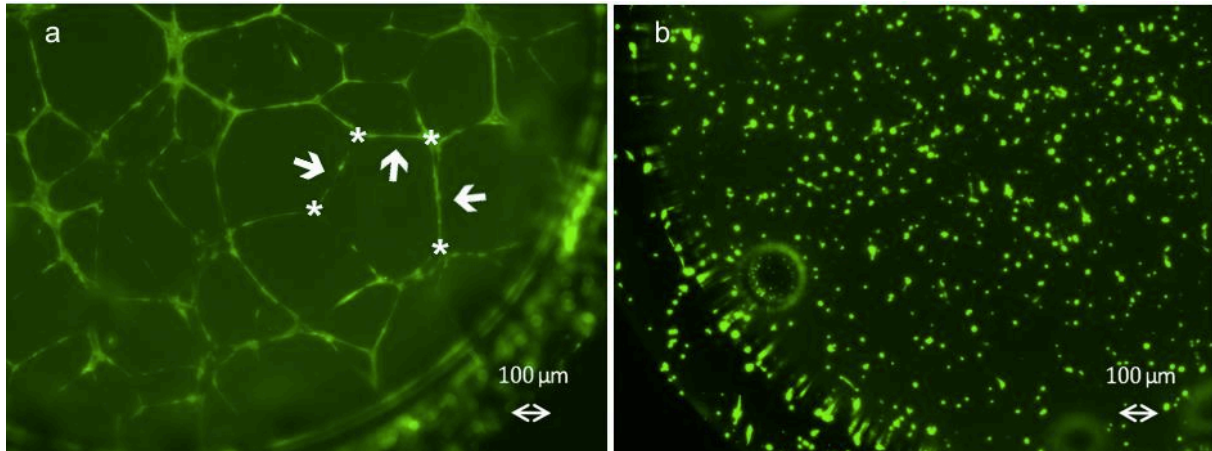


Abb. 7.a: Tube Formation Assay des Mediums HPS:PBS in der Verdünnung 1:50, exemplarische Markierung von Nodes (*) und Tubes (→), **b.** ausbleibende Ausbildung von Nodes und Tubes am Beispiel des Mediums PBS

D.3 Übersicht der Auswertungen jeder Untersuchungsgruppe

Die folgende Tabelle (Tab. 2) zeigt eine Übersicht aller insgesamt getesteten Blutprodukte, sowie die negativ Kontrolle (PBS) und die positiv Kontrolle (VEGF) mit ihrer zugehörigen verwendeten Methodik.

Zum *in vitro* Nachweis induzierter Neovessels/ Sprouting wurde ein Aortic Ring Assay durchgeführt.

Dieselben im ARA getesteten Medien wurden auch im Tube Formation Assay eingesetzt, um die Ausbildung von Tubes und Nodes nachzuweisen. Zusätzlich wurde in diesem Verfahren jedoch auch die Auswirkung einer unterschiedlichen Inkubationszeit von HPP und HPS auf ihre angiogene Wirkung beobachtet.

Tab. 2: Übersicht aller getesteten Medien mit zugehöriger Methodik

Aortic Ring Assay (Anzahl Neovessels)	Tube Formation Assay (Anzahl Tubes und Nodes)
neg. Kontrolle PBS	neg. Kontrolle PBS
pos. Kontrolle VEGF	pos. Kontrolle VEGF
Plasma (EDTA)	Plasma (EDTA)
Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation	Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation
Serum	Serum
PRP aktiviert durch CaCl ₂	PRP aktiviert durch CaCl ₂
PRP aktiviert durch Thrombin	PRP aktiviert durch Thrombin
HPP (EDTA)	HPP (EDTA)
	HPP (Heparin) 4 Tage inkubiert
	HPP (Heparin) 7 Tage inkubiert

V. Material und Methoden

	HPS 4 Tage inkubiert
	HPS 7 Tage inkubiert
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:1	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:1
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:2	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:2
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:5	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:5
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:10	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:10
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:50	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:50
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:100	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:100
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:500	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:500
Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:1000	Plasma ohne Zentrifugation : PBS 1:1000
HPP : PBS 1:1	HPP : PBS 1:1
HPP : PBS 1:2	HPP : PBS 1:2
HPP : PBS 1:5	HPP : PBS 1:5
HPP : PBS 1:10	HPP : PBS 1:10
HPP : PBS 1:50	HPP : PBS 1:50
HPP : PBS 1:100	HPP : PBS 1:100
HPP : PBS 1:500	HPP : PBS 1:500
HPP : PBS 1:1000	HPP : PBS 1:1000
Serum : PBS 1:1	Serum : PBS 1:1
Serum : PBS 1:2	Serum : PBS 1:2
Serum : PBS 1:5	Serum : PBS 1:5
Serum : PBS 1:10	Serum : PBS 1:10
Serum : PBS 1:50	Serum : PBS 1:50
Serum : PBS 1:100	Serum : PBS 1:100
Serum : PBS 1:500	Serum : PBS 1:500
Serum : PBS 1:1000	Serum : PBS 1:1000
HPS : PBS 1:1	HPS : PBS 1:1
HPS : PBS 1:2	HPS : PBS 1:2
HPS : PBS 1:5	HPS : PBS 1:5
HPS : PBS 1:10	HPS : PBS 1:10
HPS : PBS 1:50	HPS : PBS 1:50
HPS : PBS 1:100	HPS : PBS 1:100
HPS : PBS 1:500	HPS : PBS 1:500
HPS : PBS 1:1000	HPS : PBS 1:1000
	PRP + CaCl : PBS 1:1
	PRP + CaCl : PBS 1:2
	PRP + CaCl : PBS 1:5
	PRP + CaCl : PBS 1:10
	PRP + CaCl : PBS 1:50
	PRP + CaCl : PBS 1:100
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:1
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:2
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:5
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:10
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:50
	PRP + Thrombin+ CaCl : PBS 1:100

E. Statistik

Die Quantifizierungen der verwendeten Versuchsreihen verlief wie im o.g. Abschnitt „Auswertung“ beschrieben. Selbige wurden unabhängig voneinander und im Aufbau identisch durchgeführt. Zur Erleichterung der Auszählung einzelner Gefäße im ARA, bzw. der Nodes und Tubes im TFR, wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel™ verwendet. Die folgende statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes IBM SPSS® Statistics, Version 22.

Da die generierten Daten im Shapiro-Wilk Test nicht normalverteilt waren, wurde zwecks der statistischen Analyse der Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Bei der statistischen Auswertung aller hier aufgeführten Versuchsreihen wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ bei der Berechnung des α -Fehlers als statistisch signifikant betrachtet.

Die Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Microsoft PowerPoint™ und Microsoft Word™.

VI. Ergebnisse

A. Vergleich des Angiogenesepotentials unterschiedlicher Medien

An Tag 0 zeigte sich in keinem der getesteten Medien Gefäßwachstum. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde daher in Abb. 8, 9, 15, 18, 21 und 24 auf eine Darstellung des ersten Kontrolltages in der Grafik verzichtet.

An Tag 3 zeigte sich in der positiv Kontrollgruppe VEGF bereits ein deutlich stärkeres, wenn auch nicht signifikantes Gefäßwachstum als in den übrigen Vergleichsgruppen. Diese Beobachtung traf sowohl auf den Assay des männlich, als auch auf den des weiblichen Blutspenders zu (s. Abb. 8 und 9).

An Tag 6 zeigte sich das stärkste Gefäßwachstum im Assay des männlichen Spenders in den Testmedien Serum, Plasma (Heparin), PRP durch Thrombin und Calciumchlorid aktiviert und HPP (Heparin) (s. Abb.8). Unter diesen Proben war keine den genannten anderen signifikant überlegen. Dennoch zeigte sich bei diesen vier Proben ein stärkeres Gefäßwachstum als in der positiv Kontrolle VEGF (jeweils $p=1,0$).

Im Falle des weiblichen Blutspenders vermochte an Tag 8 keines der Testmedien eine stärkeres Vessel Sprouting zu generieren als VEGF (s. Abb. 9). Hierbei waren die vergleichsweise wachstumsstärksten Testmedien HPP (Heparin), HPS und Plasma (Heparin) (jeweils $p=1,0$).

An Tag 8 war das Gefäßwachstum im Assay des männlichen Spenders der Testmedien Serum, Plasma (Heparin), PRP durch Thrombin und Calciumchlorid aktiviert und HPP (Heparin) , sowie auch HPS dem Wachstum durch VEGF überlegen (jeweils $p=1,0$) (s. Abb. 8). Bei diesen fünf Testmedien wiesen die ausgesprosten Gefäße allerdings eine starke Streuung auf.

Im Assay des weiblichen Blutspenders (s. Abb. 9) war das stärkste Sprouting in den Medien HPP (Heparin) und Plasma (Heparin) auszumachen, welche beide eine starke Streuung der Gefäßanzahl aufwiesen, jedoch beide mehr Sprouting initiierten als die positiv Kontrolle VEGF (jeweils $p=1,0$).

Spenderunabhängig war jederzeit das Gefäßwachstum der negativ Kontrolle PBS, sowie der Medien HPP (EDTA), Plasma (EDTA), Heparin, EDTA PBS, sowie Thrombin vernachlässigbar gering oder blieb ganz aus (s. Abb. 8 und 9).

VI. Ergebnisse

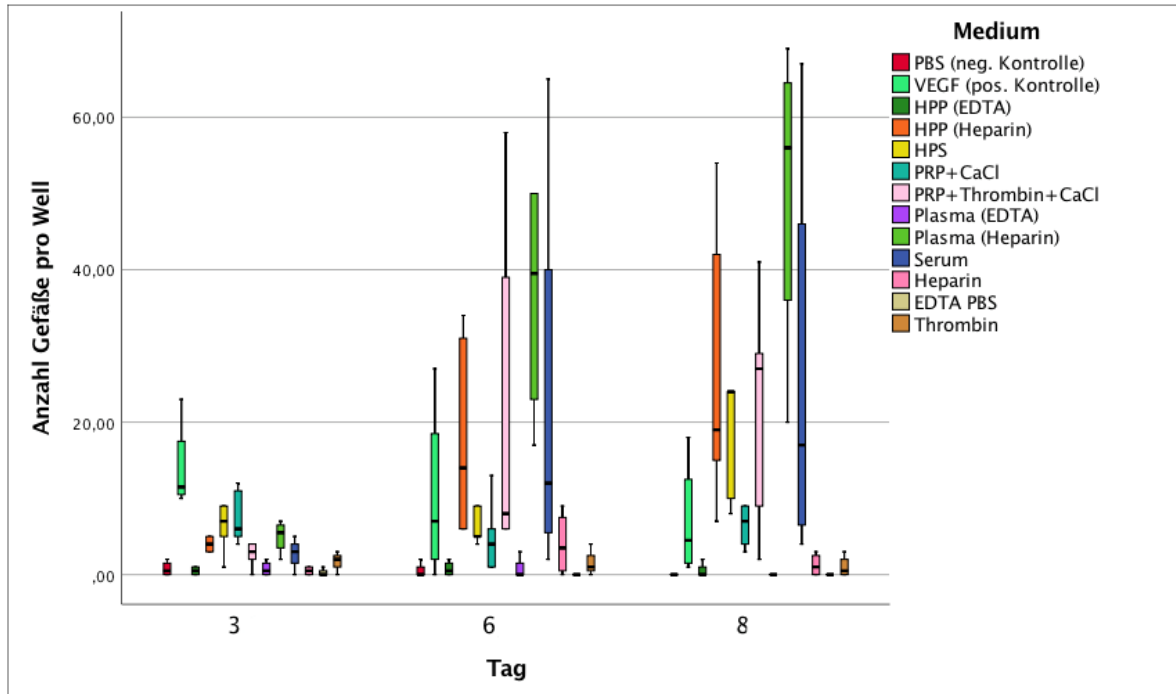


Abb. 8a: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich

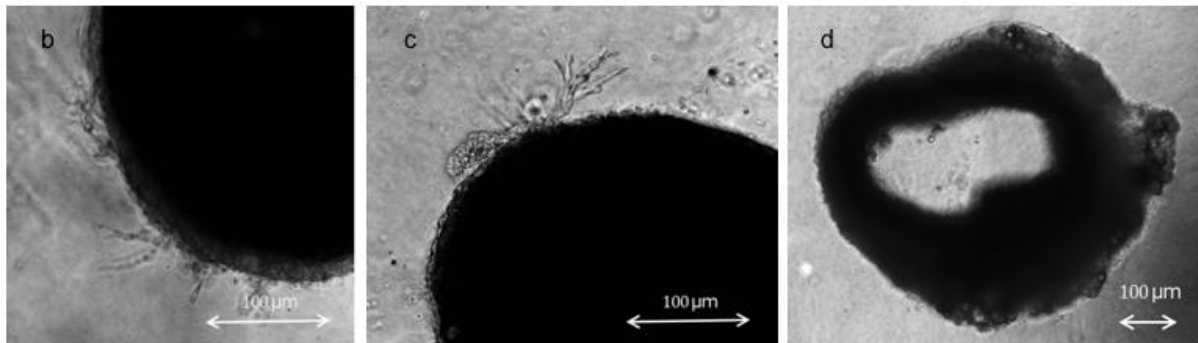


Abb. 8b: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich, HPS (200x Vergrößerung), c. Serum (200x Vergrößerung), d. Heparin (100x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

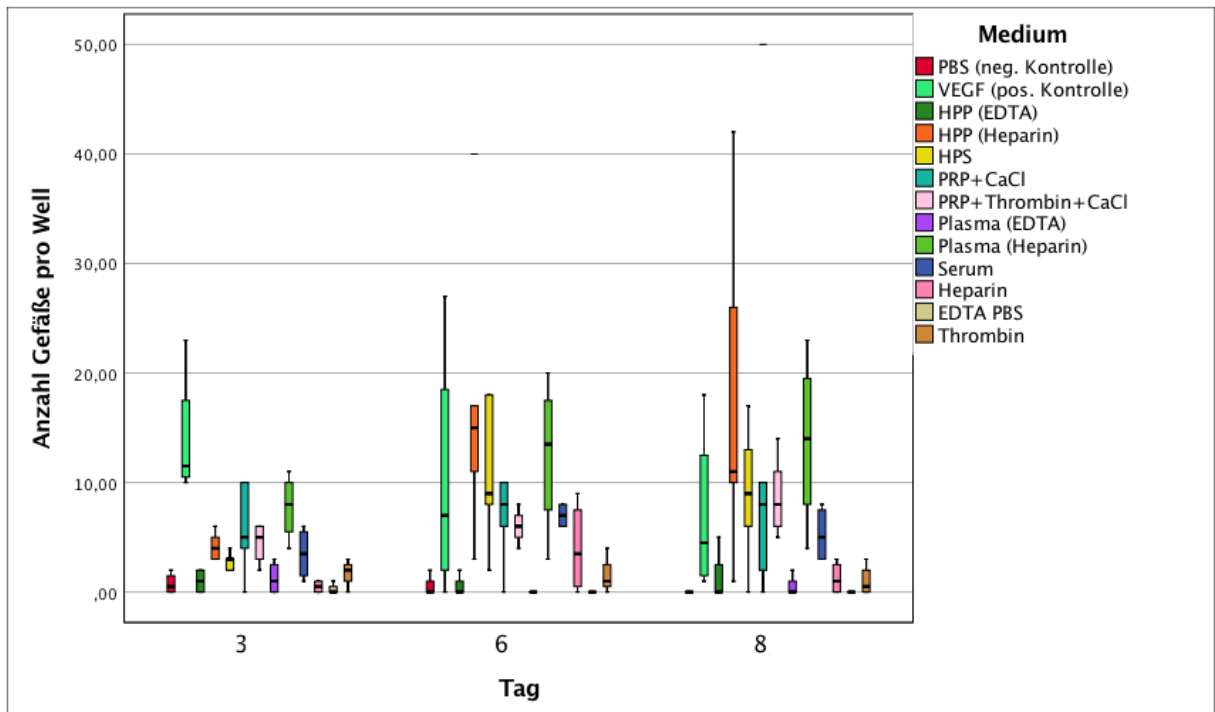


Abb. 9a: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich

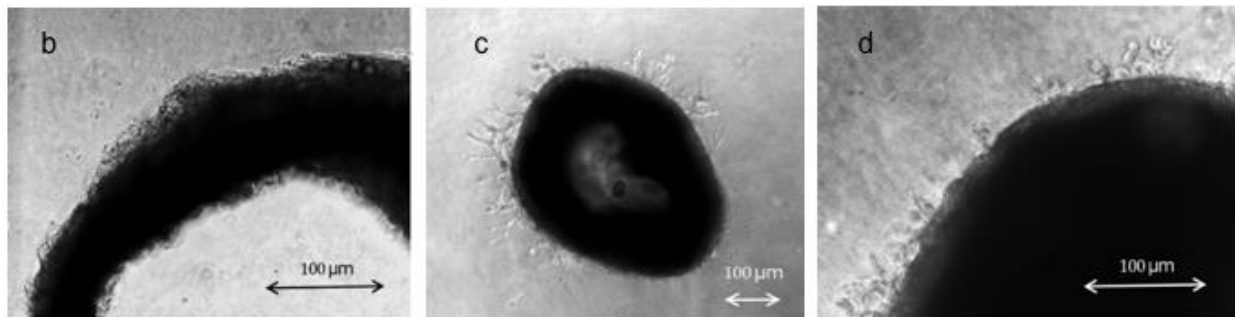


Abb. 9b: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich, HPP EDTA (200x Vergrößerung), c. HPP Heparin (100x Vergrößerung), d. PRP+Thrombin+CaCl (200x Vergrößerung)

Im Tube Formation Assay wurde das angiogene Potential derselben Medien wie schon im Aortic Ring Assay evaluiert.

Wie schon im Aortic Ring Assay wurde für den Tube Formation Assay VEGF als positiv und PBS als negativ Kontrolle festgelegt. Es wurden Blutprodukte von einem männlichen, sowie zwei weiblichen Spendern auf ihre Induktion von Tubes und Nodes getestet. Spenderunabhängig bildeten sich im PBS weder Tubes noch Nodes (s. Abb. 10-12).

VI. Ergebnisse

Im Tube Formation Assay des männlichen Spenders waren die angiogenese-stärksten Produkte PRP (durch Calciumchlorid oder Calciumchlorid und Thrombin aktiviert) (s. Abb. 10). Ihre Tube Induktion war (nicht signifikant) stärker als die durch HPP oder HPS und wies eine weniger starke Streuung von Tubes und Nodes auf.

Die Tube Formation der Blutprodukte beider weiblicher Blutspender unterschied sich nicht wesentlich. In Abb. 11 und 12 zeigt sich eine (nicht signifikant) erhöhte angiogene Aktivität von HPP (Heparin) und HPS verglichen mit den beiden PRPs (s. Abb. 11 und 12). Auch hier wiesen Tubes und Nodes, welche durch HPP (Heparin) und HPS induziert waren, eine breitere Streuung auf, als es bei den PRP Produkten der Fall war.

Wie schon im Aortic Ring Assay zeigte sich im Tube Formation Assay aller Blutspender durch die Medien PBS (negativ Kontrolle), HPP (EDTA), Plasma (EDTA), Heparin und EDTA PBS kein Anzeichen einer Angiogeneseinduktion (s. Abb. 10-12).

Zur Vereinfachung der Übersicht sind nicht alle Versuchsgruppen mit mikroskopischen Beispielen versehen, sondern vor allem Eigenblutderivate, sowie VEGF als positiv Kontrolle und PBS als negativ Kontrolle.

VI. Ergebnisse

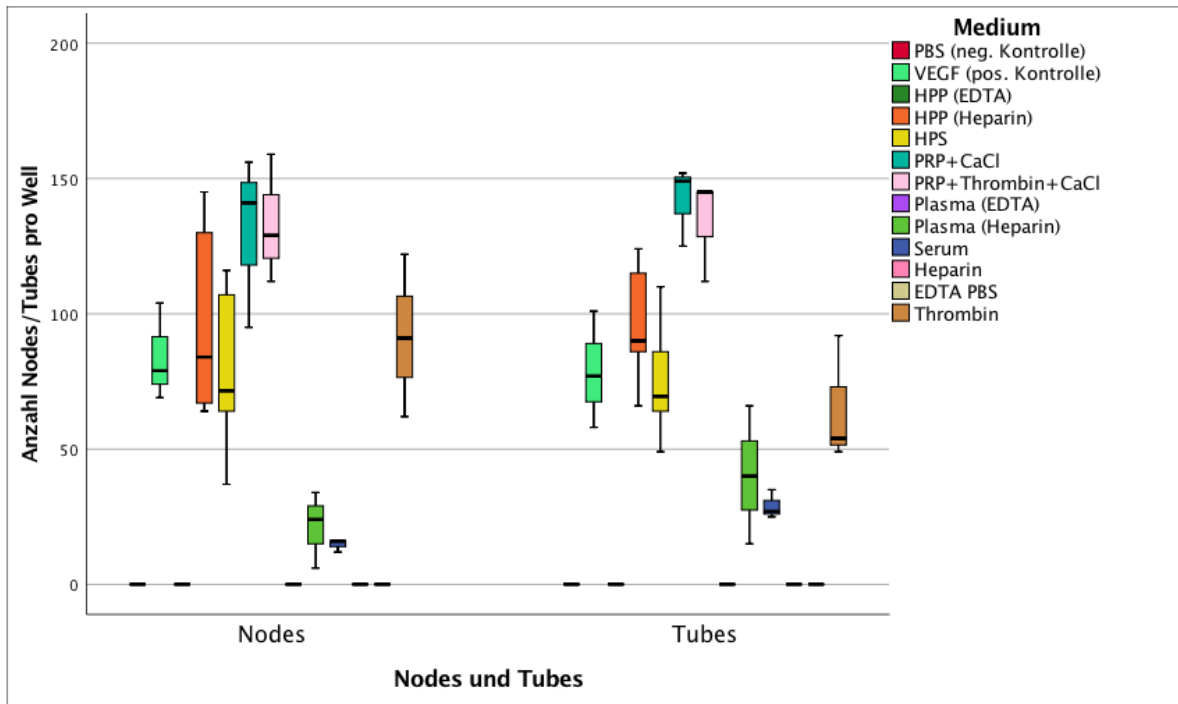


Abb. 10a: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

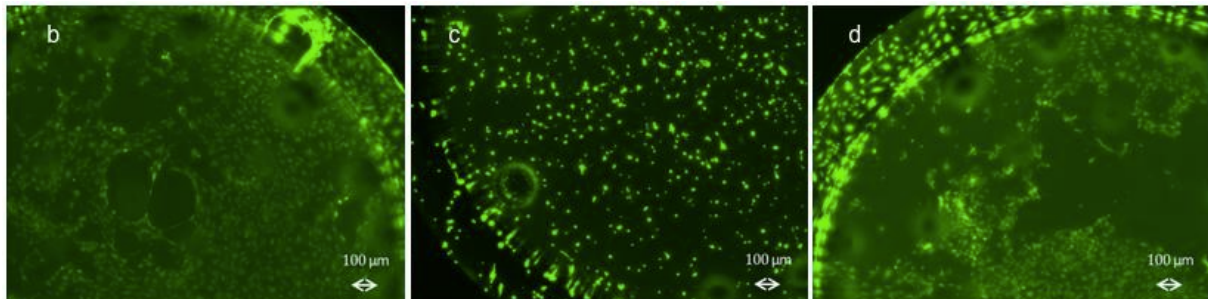


Abb. 10b: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich, Plasma, c. Thrombin, d. HPP Heparin, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

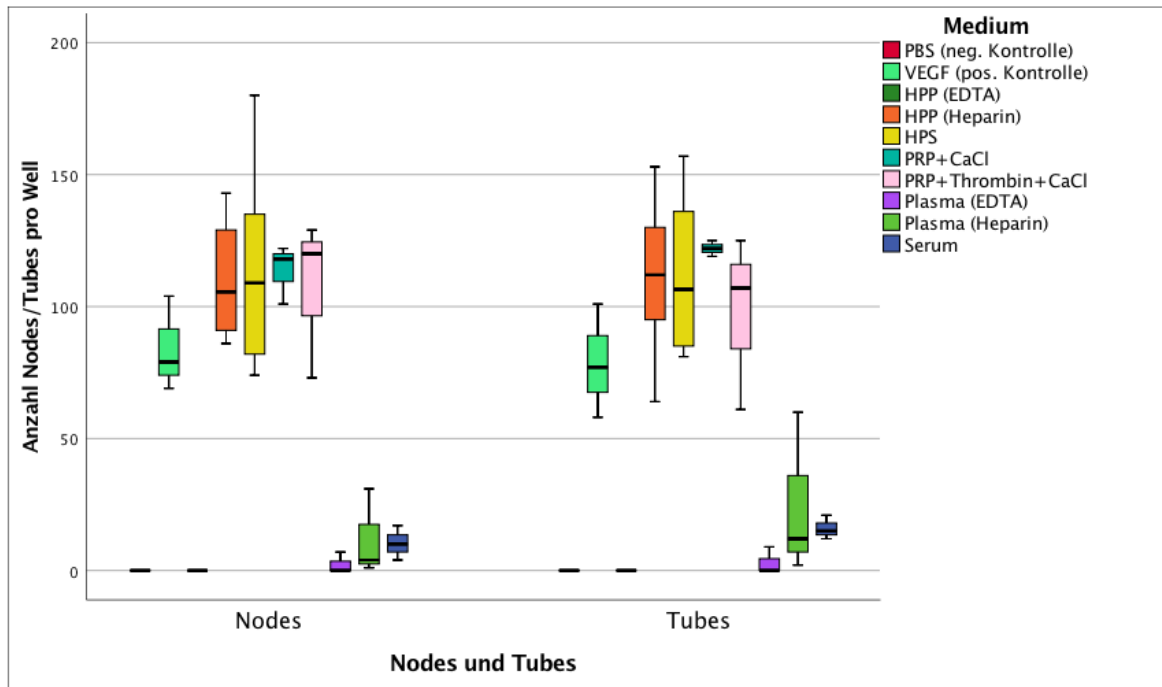


Abb. 11a: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

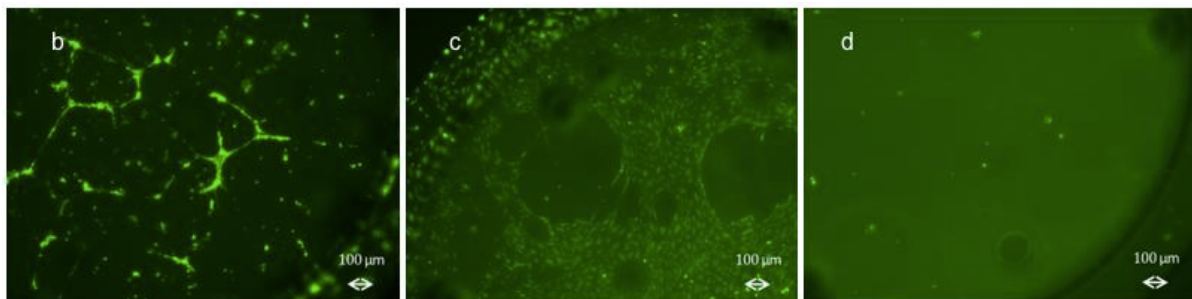


Abb. 11b: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich, VEGF, c. HPP, d. HPP EDTA, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

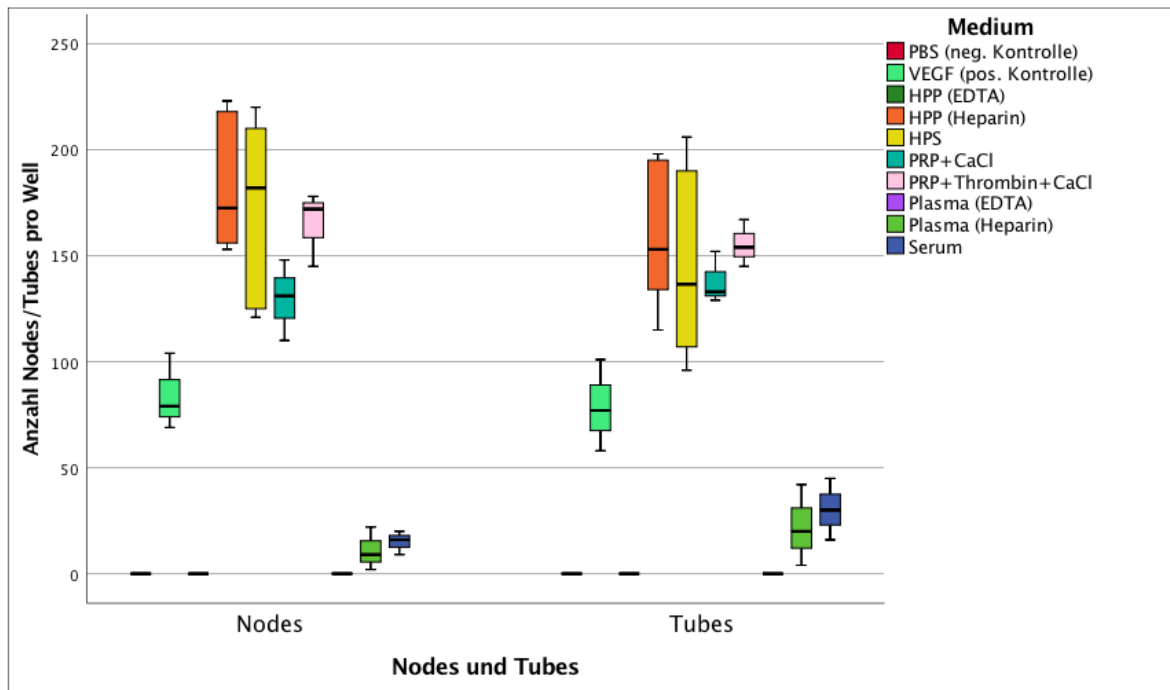


Abb. 12a: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 24 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

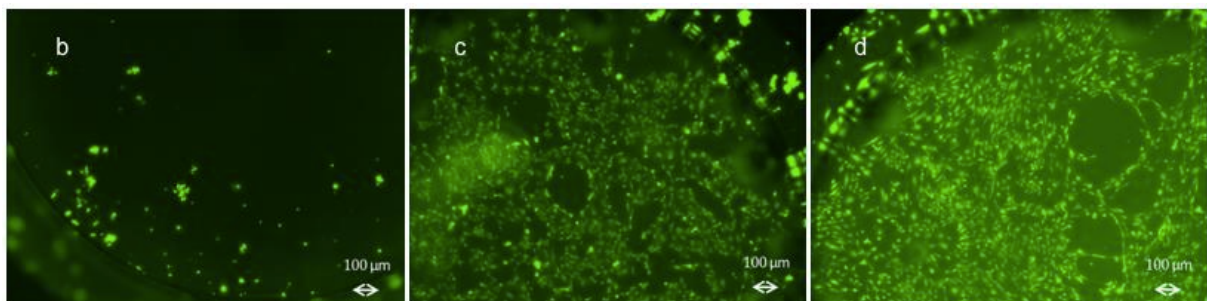


Abb. 12b: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 24 Jahre, weiblich, PBS **c.** Serum, **d.** HPS, (50x Vergrößerung)

B. Auswirkung der Inkubationszeit auf das Angiogenesepotential von hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten

In folgendem Teilversuch ging es darum, herauszufinden, inwiefern sich die Dauer der hypoxischen Präkonditionierung auf die Tube Formation von Plasma und Serum auswirkt. Als positiv Kontrolle diente auch hierbei wieder VEGF, als negativ Kontrolle PBS. Es wurde zudem sowohl ein Assay mit Blutprodukten eines männlichen Spenders (s. Abb. 13), wie auch der eines weiblichen Spenders (s. Abb. 14) miteinander verglichen.

Im Tube Formation Assay des männlichen Blutspenders wurden kein wesentlicher Unterschied in der Tube Formation zwischen den unterschiedlich aufbereiteten Plasma und HPP Produkten festgestellt (s. Abb. 13). Ähnlich verhielt es sich auch zwischen den Medien Serum und HPS, welches für 4 Tage hypoxisch präkonditioniert worden ist. Lediglich HPS, welches für 7 Tage unter Hypoxie inkubiert wurde, induzierte auf die HUVECs eine nicht signifikant stärkere Tube Formation als Plasma, HPP (4 Tage inkubiert), Serum und HPS (4 Tage inkubiert). Insgesamt blieb das Ergebnis jedoch immer noch unter der Tube Formation der Kontrollgruppe VEGF (s. Abb. 13).

Anders verhielt es sich im Tube Formation Assay des weiblichen Blutspenders. Auch hier waren weder Plasma noch Serum imstande, eine stärkere Tube Formation zu induzieren als VEGF (s. Abb. 14). Dies gelang jedoch durch jeweils 4-tägig hypoxisch präkonditioniertes HPP und HPS, obgleich auch hier kein signifikant stärkeres Ergebnis erzielt worden ist. Die Tube Formation von 7 Tage lang hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten (hypB) lag (nicht signifikant) hinter den 4 Tage inkubierten hypB zurück.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind im Folgenden nur mikroskopische Aufnahmen von HPP und HPS aufgeführt. Die Fragestellung dieses Versuchsabschnittes zielt außerdem vor allem auf die Beeinflussung der Inkubationsdauer von hypB ab.

VI. Ergebnisse

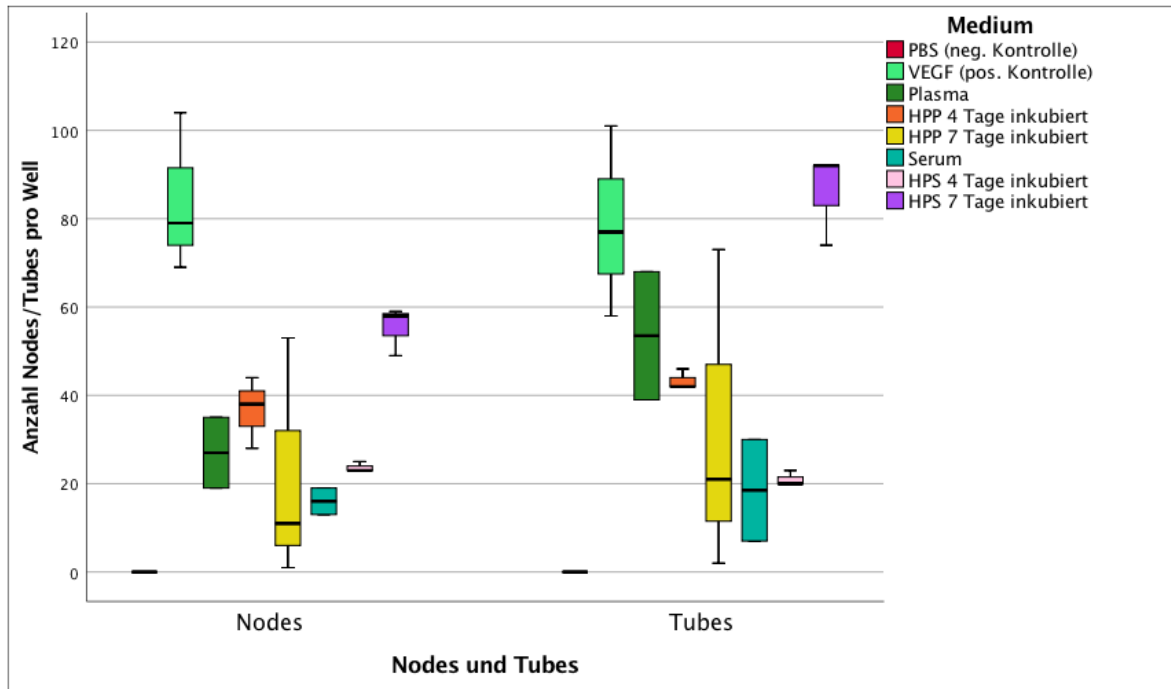


Abb. 13a: Tube Formation Assay hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte unterschiedlicher Inkubationszeit, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

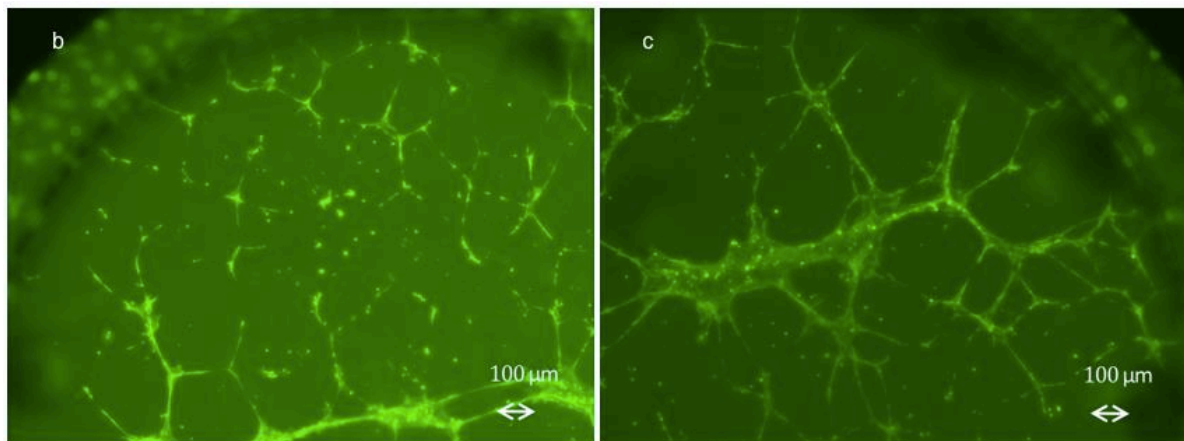


Abb. 13b: Tube Formation Assay HPS 4 Tage inkubiert, Blutspender 26 Jahre, männlich, **c.** HPS 7 Tage inkubiert, (beide in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

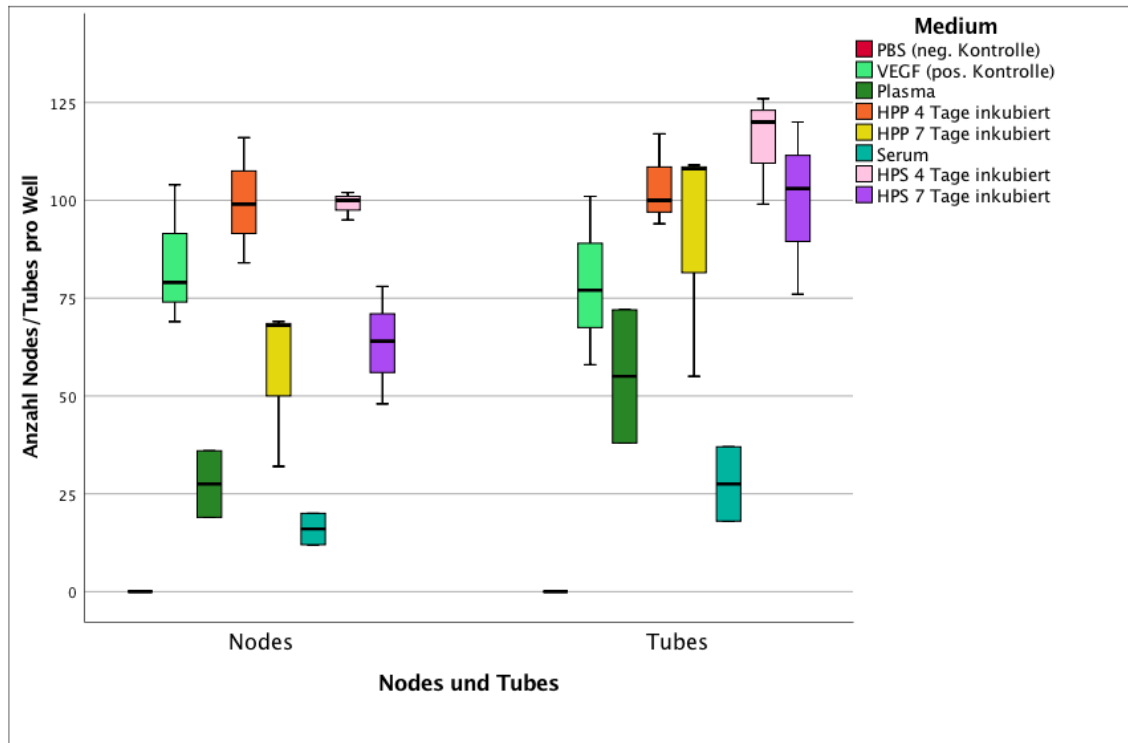


Abb. 14a: Tube Formation Assay hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte unterschiedlicher Inkubationszeit, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

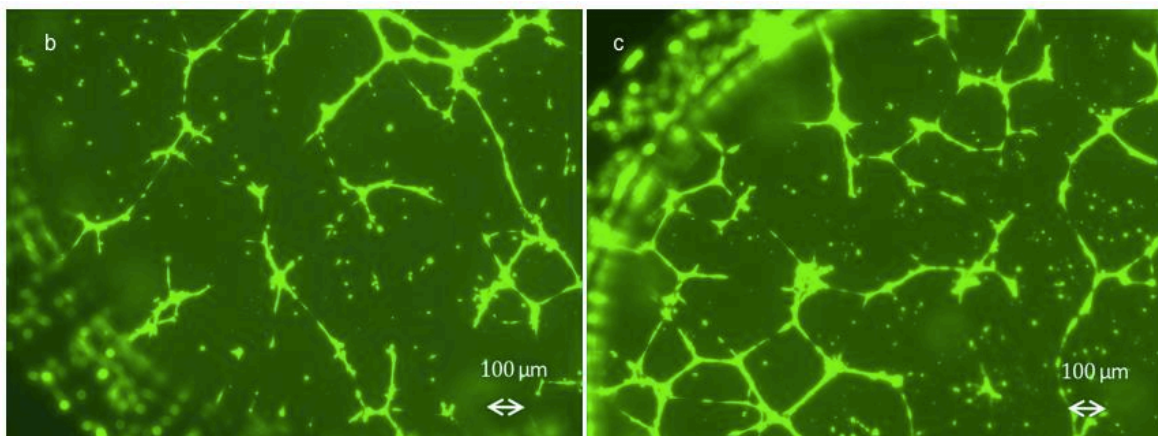


Abb. 14b: Tube Formation Assay HPP 4 Tage inkubiert, Blutspender 23 Jahre, weiblich, **c.** HPP 7 Tage inkubiert, (beide in 50x Vergrößerung)

C. Auswirkung der Verdünnung von Blutprodukten auf das Angiogenesepotential

Die folgenden Teilversuche wurden unter der Fragestellung durchgeführt, in wie fern sich die Verdünnung von Plasma, HPP; Serum, HPS, PRP mit Calciumchlorid und PRP mit Thrombin und Calciumchlorid auf ihr jeweiliges angiogenes Potential auswirkt.

C.1 Angiogenese unter verdünntem Plasma

Im Aortic Ring Assay des verdünnten Plasmas (s. Abb. 15) zeigte sich an Tag 3 in den Verdünnungsstufen 1:1,1:2, 1:5, sowie 1:10 ein (nicht signifikant) stärkeres Gefäßwachstum als in den übrigen Vergleichsgruppen und den Kontrollmedien.

An Tag 6 zeigte sich bereits, dass die stärkste Angiogeneseresponse durch 1:5 verdünntes Plasma zu generieren war, gefolgt von den Verdünnungen 1:10 und 1:2. Es wird deutlich, dass das Gefäßwachstum bis zur Plasmaverdünnung von 1:5 proportional ansteigt und bei weiterer Verdünnung wieder abfällt. Dieser Verlauf blieb auch an Tag 8 bestehen. Zu diesem Zeitpunkt war die Anzahl der gewachsenen Gefäße in der Verdünnung 1:5 signifikant größer als die der Verdünnung 1:1000 ($p=0,025$). Ebenso war auch das Vessel Sprouting der Plasmaverdünnung 1:10 signifikant stärker, als das der Verdünnung 1:1000 ($p=0,038$).

VI. Ergebnisse

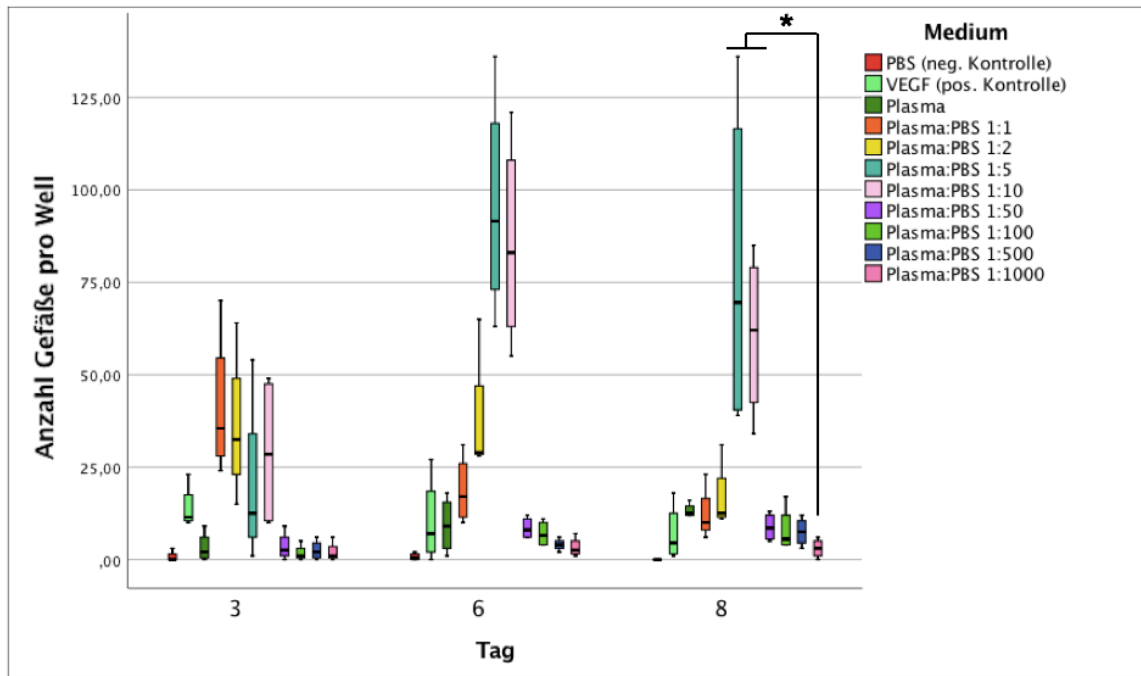


Abb. 15a: Aortic Ring Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich, * = $p < 0,05$.

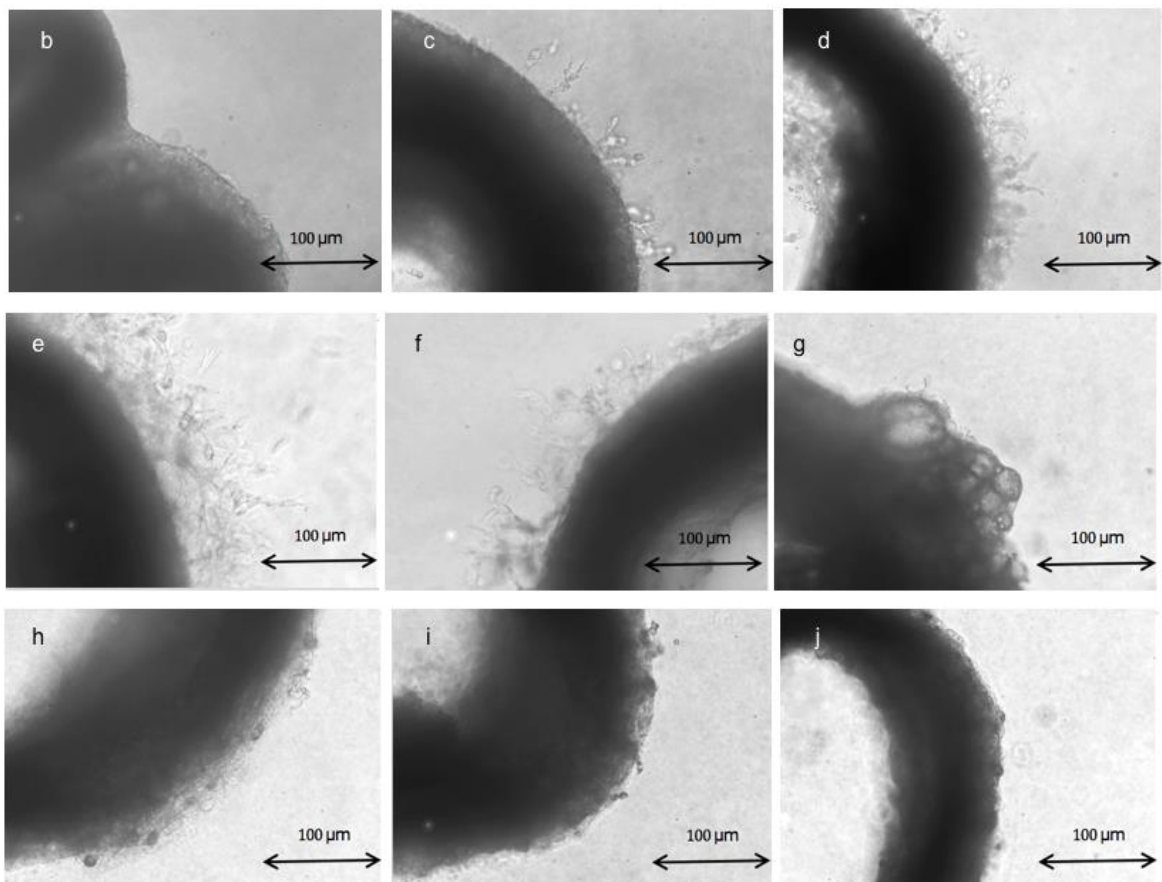


Abb. 15b: Aortic Ring Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich, *b.* Plasma pur, *c.* Plasma:PBS 1:1, *d.* Plasma:PBS 1:2, *e.* Plasma:PBS 1:5, *f.* Plasma:PBS 1:10, *g.* Plasma:PBS 1:50, *h.* Plasma:PBS 1:100, *i.* Plasma:PBS 1:500, *j.* Plasma:PBS 1:1000, (alle in 200x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

Im Tube Formation Assay des männlichen und weiblichen Spenders (s. Abb. 16 und 17) zeigte sich im Vergleich zum Aortic Ring Assay (s. Abb. 15) eine Verlagerung des Wachstumsmaximums zugunsten der Plasma Verdünnung 1:500. Es wurde deutlich, dass sowohl die Anzahl der Tube- als auch die der Node-Formation unter einer Plasma Verdünnung bis zu 1:500 anstieg, um ab einer Plasmaverdünnung von 1:1000 wieder zu sinken. Dies traf auf die Blutderivate beider Geschlechter gleichermaßen zu.

VI. Ergebnisse

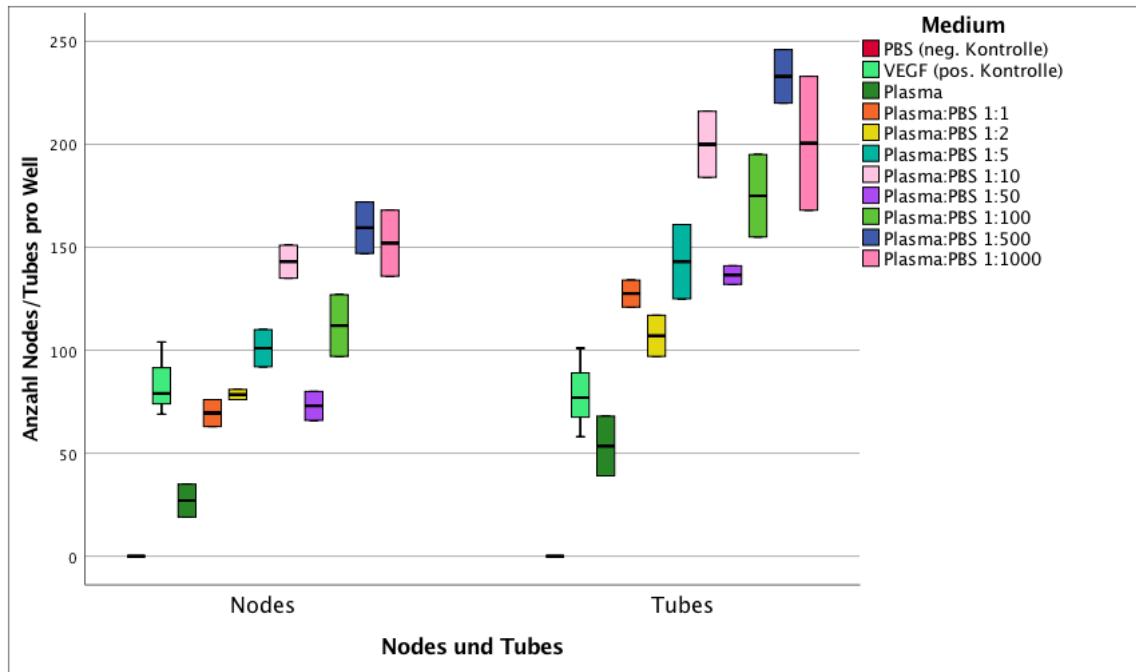


Abb. 16a: Tube Formation Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

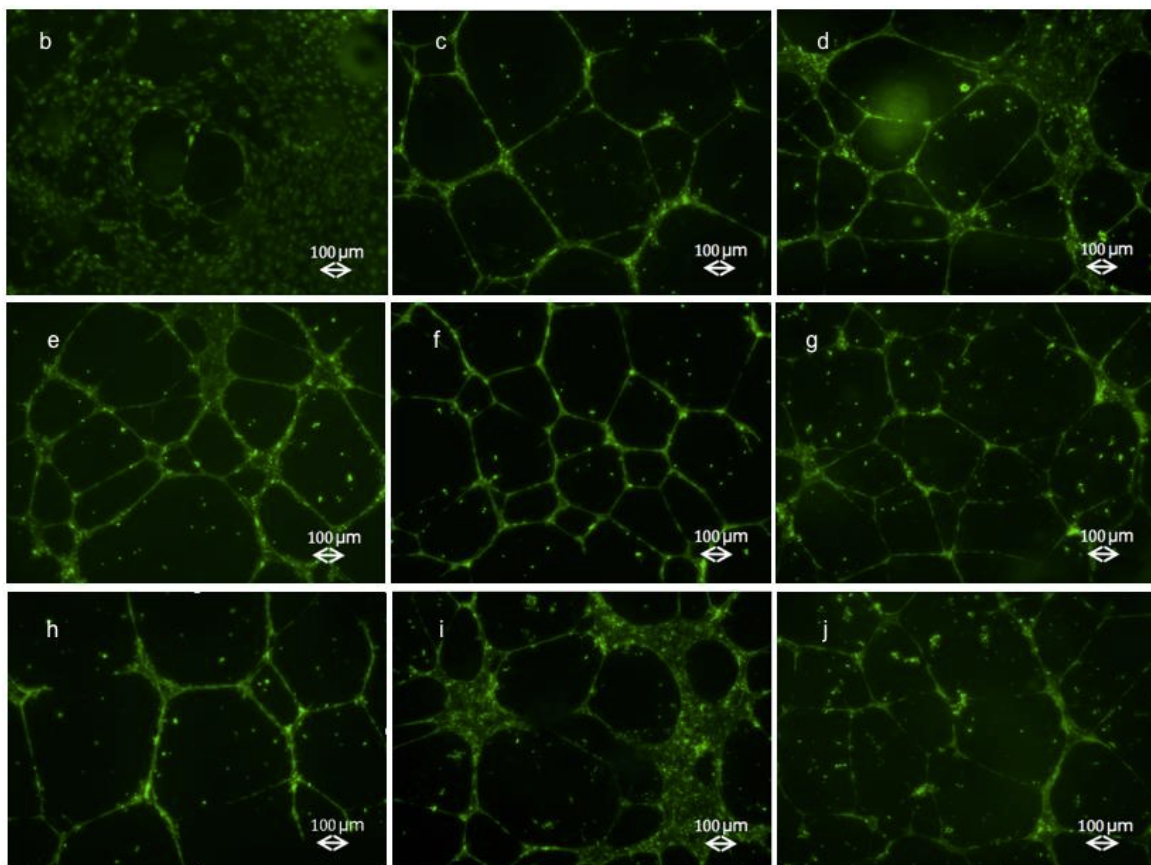


Abb. 16b: Tube Formation Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich, Plasma pur, c. Plasma:PBS 1:1, d. Plasma:PBS 1:2, e. Plasma:PBS 1:5, f. Plasma:PBS 1:10, g. Plasma:PBS 1:50, h. Plasma:PBS 1:100, i. Plasma:PBS 1:500, j. Plasma:PBS 1:1000, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

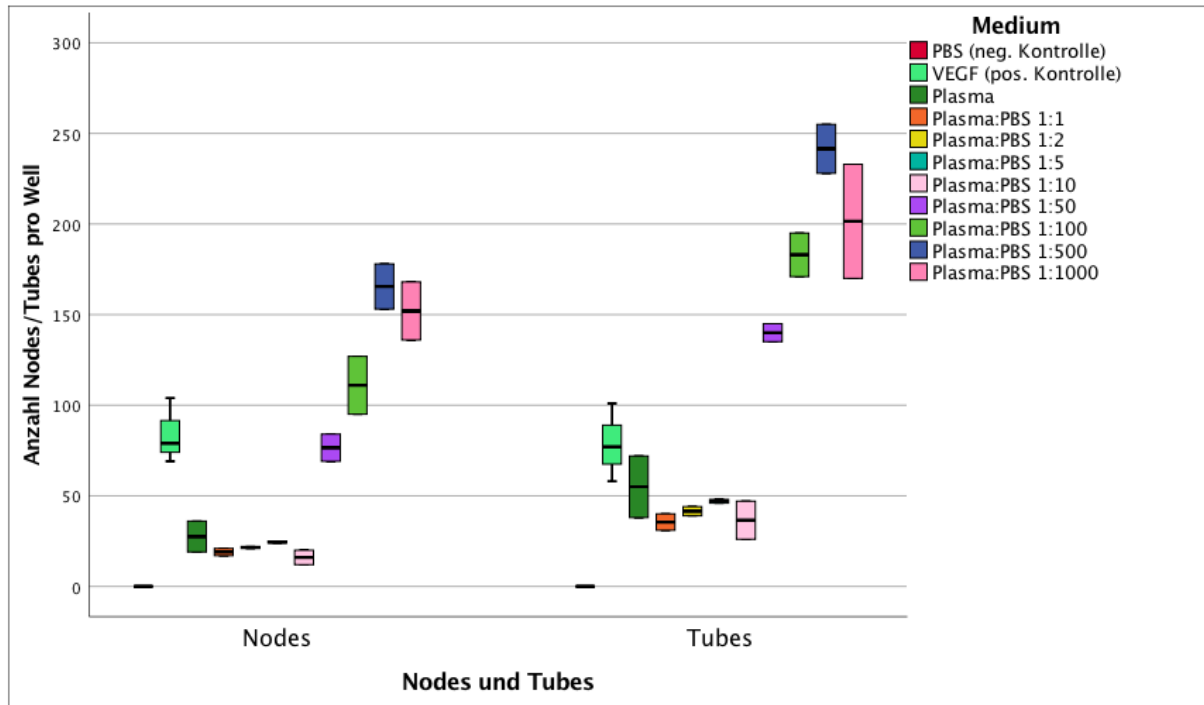


Abb. 17: Tube Formation Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

C.2 Angiogenese unter verdünntem HPP

Im Aortic Ring Assay des verdünnten HPP (s. Abb. 18) zeigte sich an Tag 3 kein wesentlicher Unterschied in der Gefäßausprossung der unterschiedlichen HPP Verdünnungen. Am sechsten Tag induzierte das unverdünnte HPP jedoch trotz starker Streuung in der Gefäßanzahl der behandelten Aortenringe eine deutlich stärkere Angiogeneserate (Anzahl der ausgesprossenen Gefäße 38 bis maximal 156 pro Aortenring). Die Gefäßanzahl durch HPP war signifikant höher als die der positiven Kontrollgruppe VEGF ($p=0,020$) und signifikant höher als die der Vergleichsgruppe HPP in der Verdünnung 1:500 ($p=0,038$). Dieser Trend setzte sich auch an Tag 8 fort, sodass auch hier die mit Abstand stärkste Wachstumsrate in der Gruppe des unverdünnten HPP zu verzeichnen war und dieses erneut signifikant stärkeres Vessel Sprouting induzierte, als es VEGF vermochte ($p=0,016$).

VI. Ergebnisse

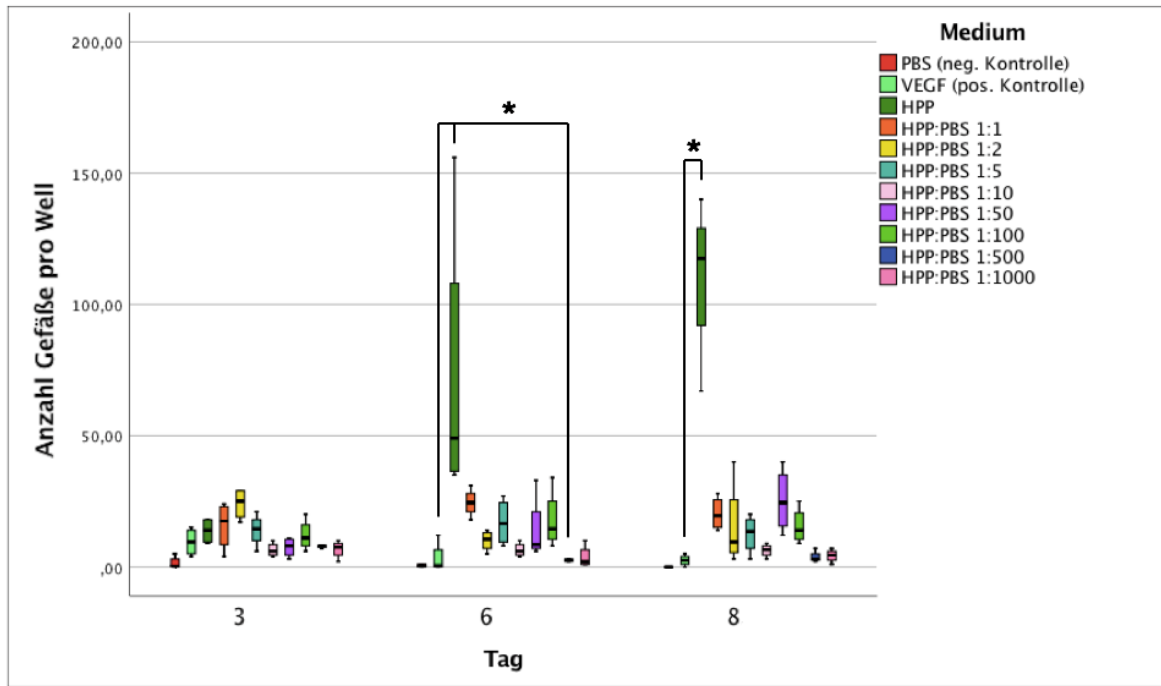


Abb. 18a: Aortic Ring Assay von verdünntem HPP, Blutspender 26 Jahre, männlich, * = $p < 0,05$

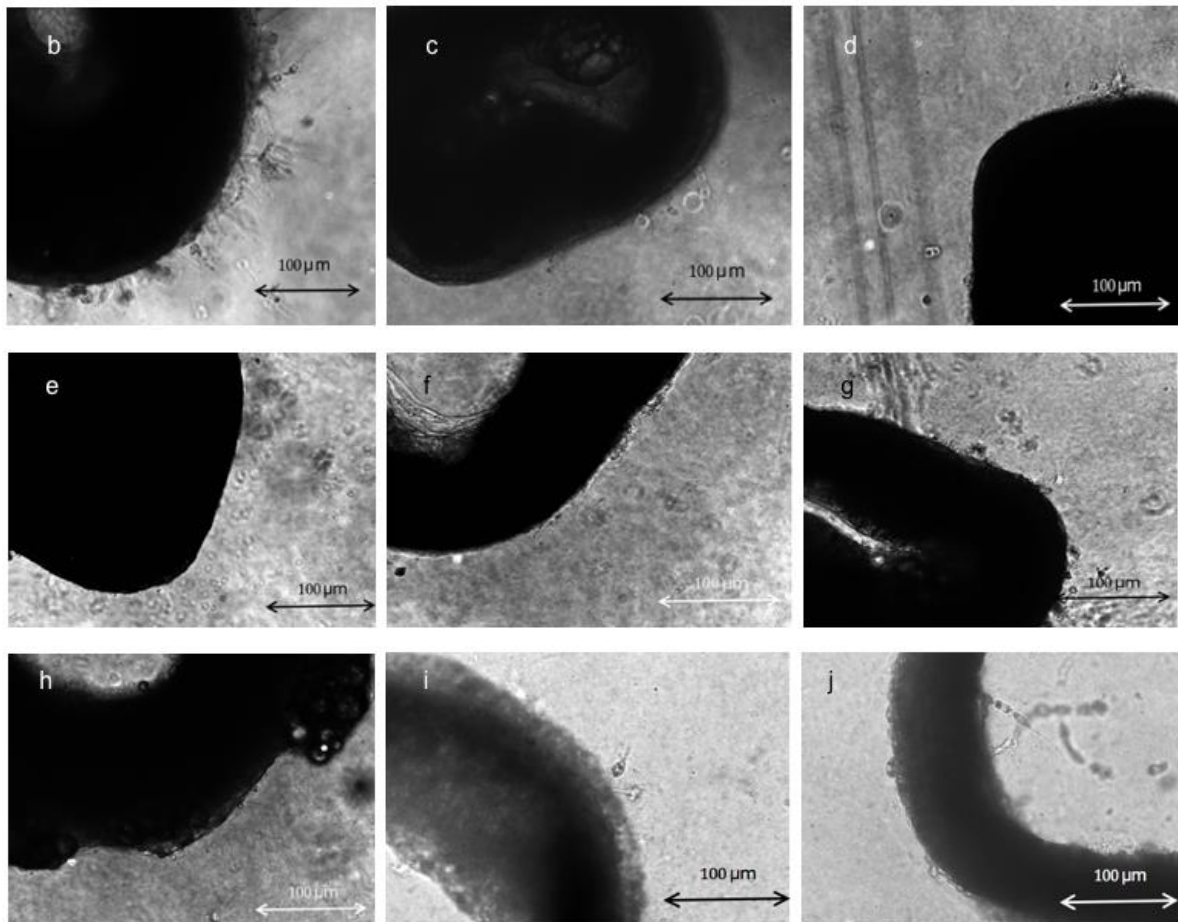


Abb. 18b: Aortic Ring Assay verdünnten HPPs, Blutspender 26 Jahre, männlich, HPP pur, c. HPP:PBS 1:1, d. HPP:PBS 1:2, e. HPP:PBS 1:5, f. HPP:PBS 1:10, g. HPP:PBS 1:50, h. HPP:PBS 1:100, i. HPP:PBS 1:500, j. HPP:PBS 1:1000, (alle in 200x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

Im Tube Formation Assay des verdünnten HPP (s. Abb. 19 und 20) war zu sehen, dass sowohl im Assay des männlichen, wie auch in dem des weiblichen Blutspenders die Anzahl an Tubes und Nodes mit zunehmender HPP Verdünnung stieg. Ihr Maximum erreichten Tubes und Nodes unter dem Einfluss von HPP, welches in einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:100 vorlag. Ab einer weiteren Verdünnung von 1:500 wurde eine deutlich schwächere Formation der HUVEC erreicht.

VI. Ergebnisse

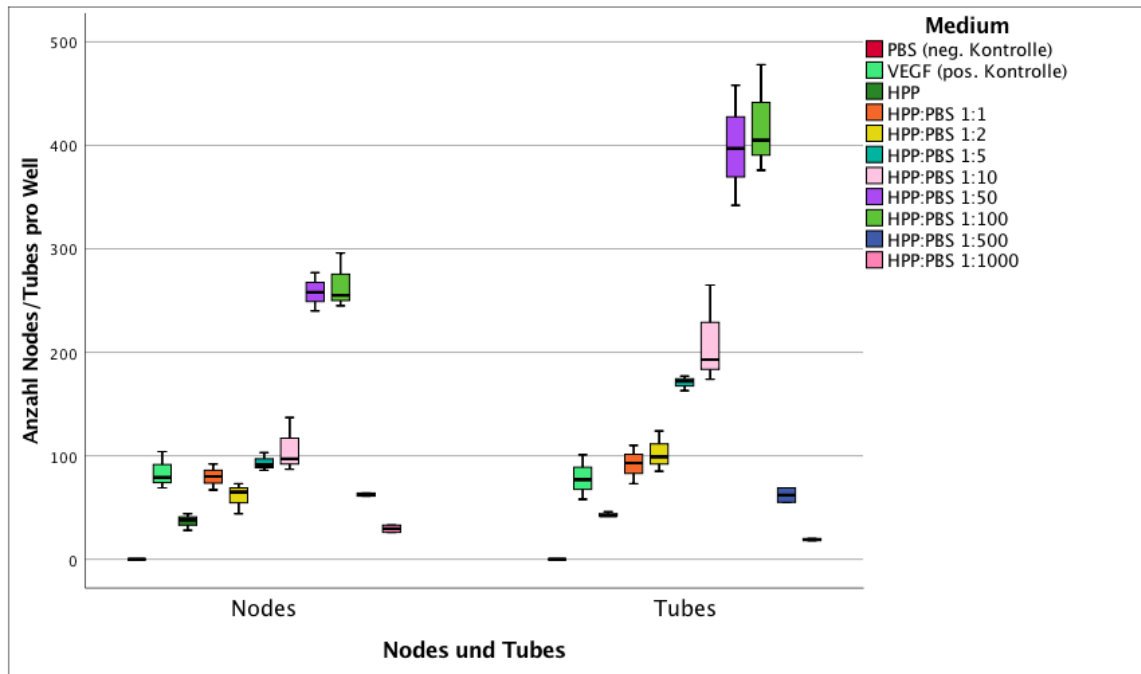


Abb. 19a: Tube Formation Assay von verdünntem HPP, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

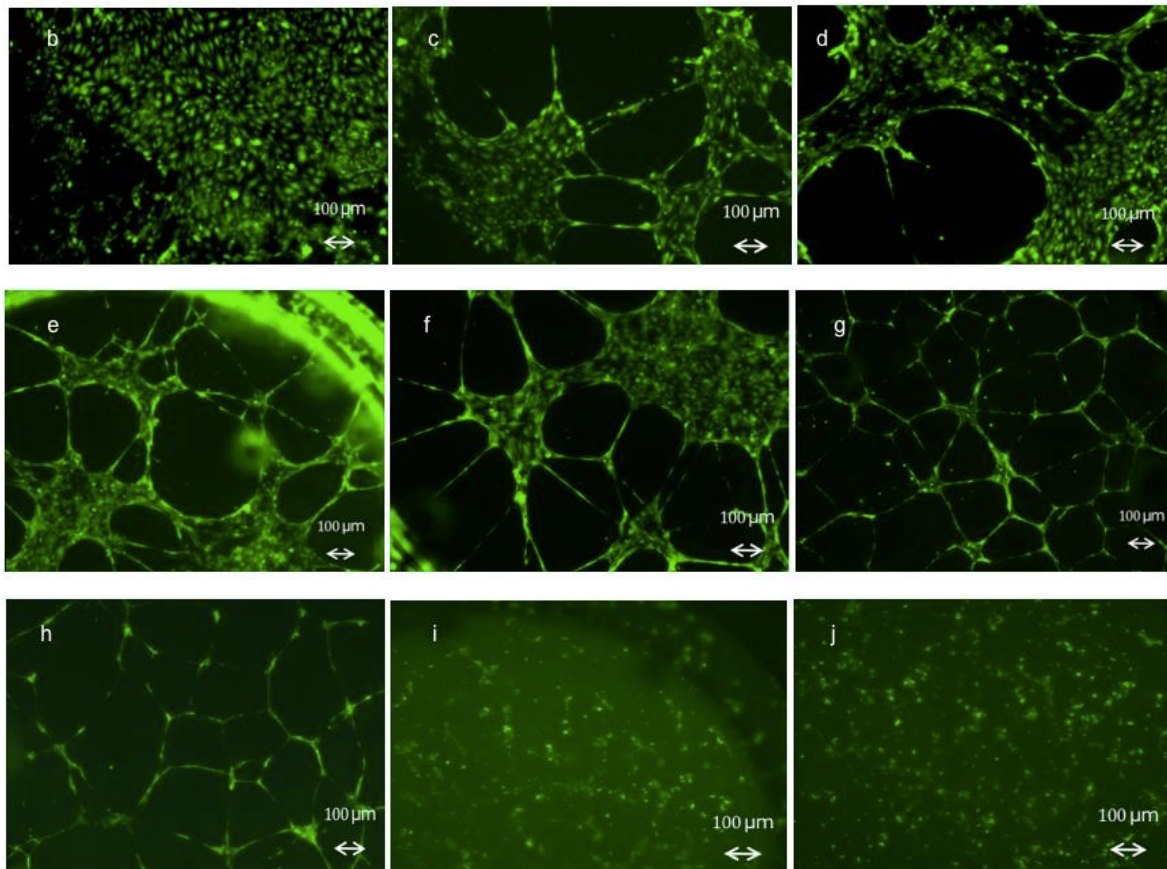


Abb. 19b: Tube Formation Assay verdünnten HPPs, Blutspender 26 Jahre, männlich, HPP pur, c. HPP:PBS 1:1, d. HPP:PBS 1:2, e. HPP:PBS 1:5, f. HPP:PBS 1:10, g. HPP:PBS 1:50, h. HPP:PBS 1:100, i. HPP:PBS 1:500, j. HPP:PBS 1:1000, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

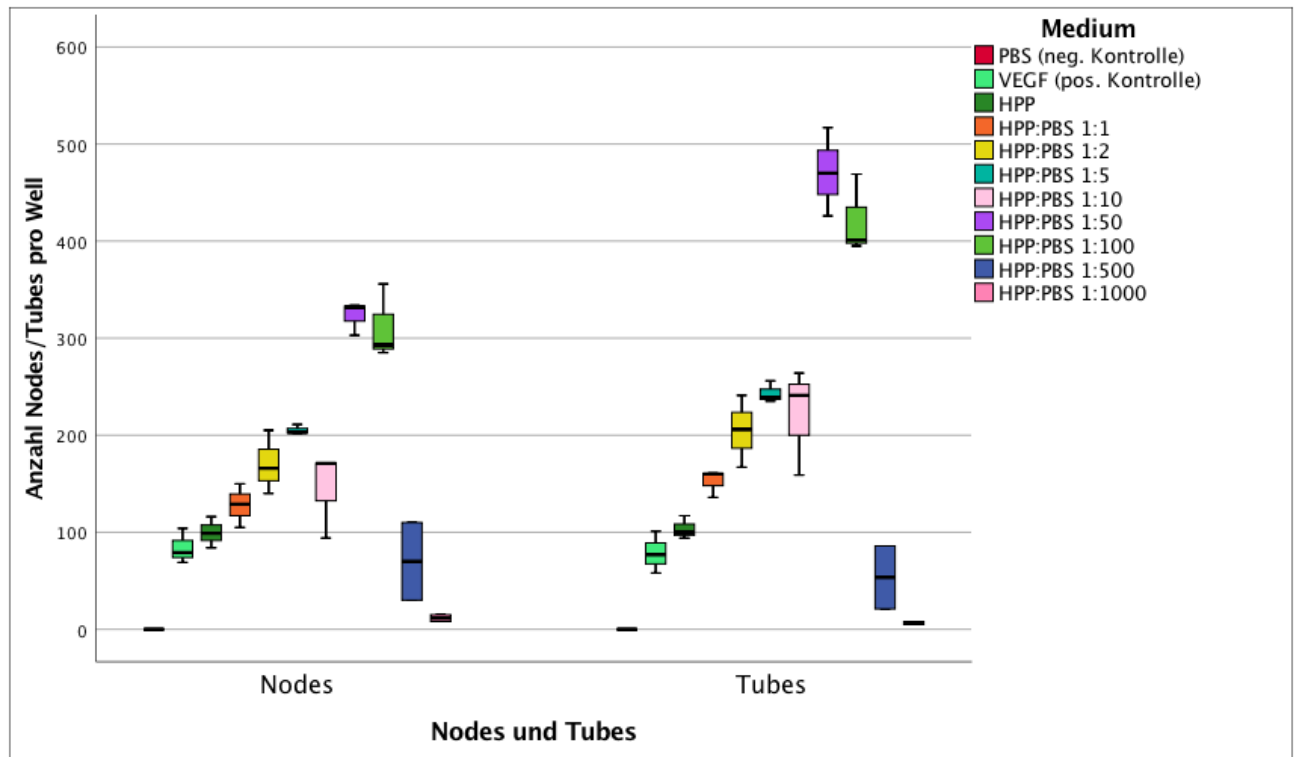


Abb. 20: Tube Formation Assay von verdünntem HPP, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

C.3. Angiogenese unter verdünntem Serum

Im Aortic Ring Assay des verdünnten Serums (s. Abb. 21) zeigte sich an Tag 3 ein starkes Vessel Sprouting durch Serum, welches jeweils 1:2 und 1:5 verdünnt wurde. Das Gefäßwachstum unter diesen beiden Gruppen war signifikant stärker, als das der Vergleichsgruppe, in der das Serum 1:1000 verdünnt worden ist ($p=0,013$ bzw $p=0,005$). Ebenso verhielt es sich an Tag 6, hier war das Gefäßwachstum unter 1:2 verdünntem Serum signifikant stärker als das unter der 1:1000 Verdünnung ($p=0,015$). Auch die Verdünnung 1:5 war mit $p=0,027$ signifikant pro-angiogener als die Serum Verdünnung 1:1000. Ihren Klimax erreichte das Gefäßwachstum somit bis Tag 6 unter einer Serum-Verdünnung von 1:2 bzw. 1:5, um bei weiterer Verdünnung wieder ein schwächeres Gefäßwachstum zu induzieren.

An Tag 8 zeigte sich ein Wachstumsmaximum unter den Verdünnungen 1:1 und 1:10, die Wachstumswahlen der Verdünnungen 1:2 und 1:5 fielen knapp dahinter zurück.

VI. Ergebnisse

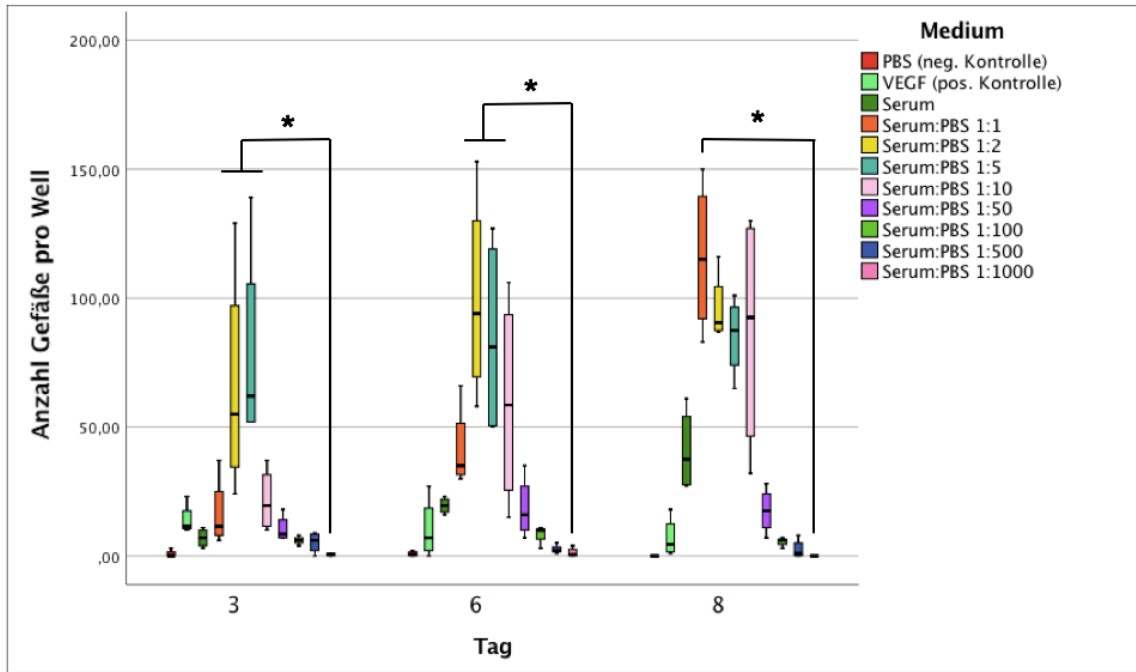


Abb. 21a: Aortic Ring Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich, * = $p < 0,05$

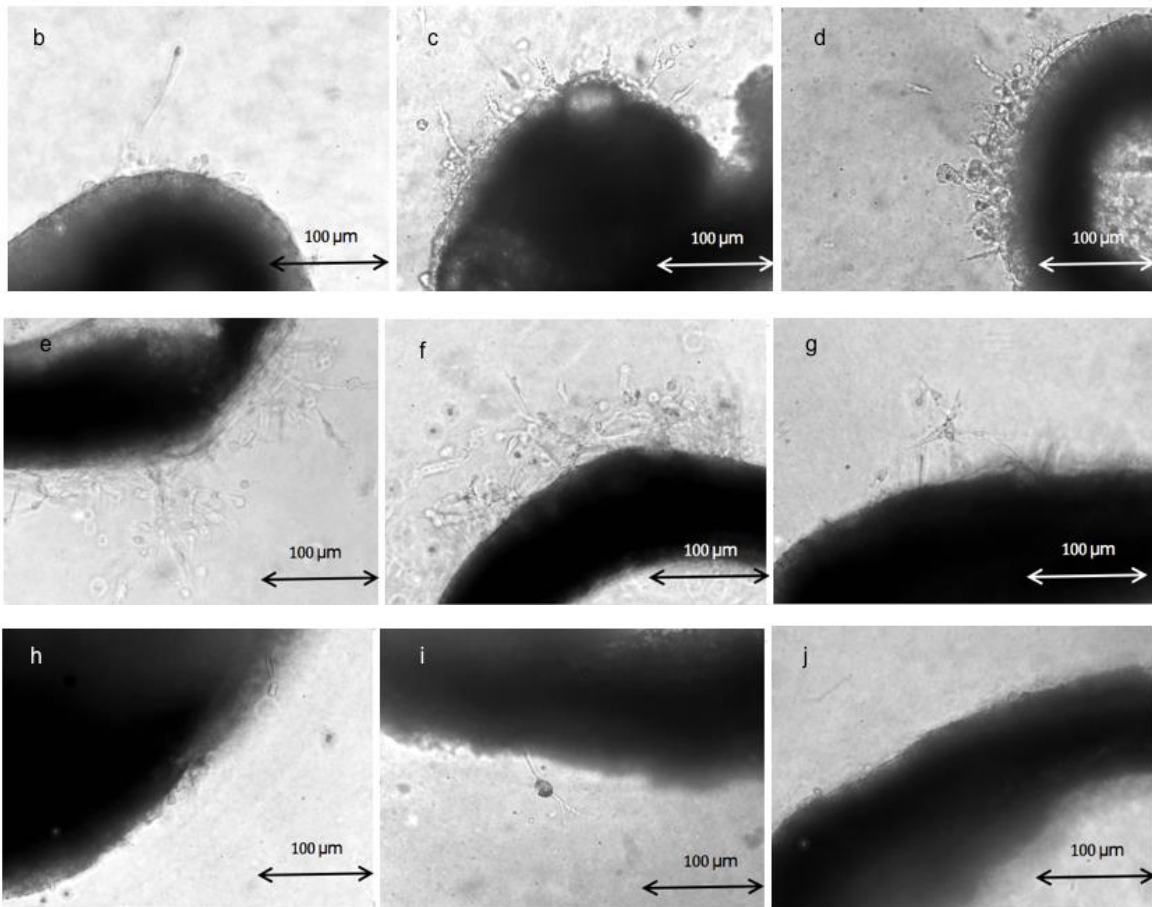


Abb. 21b: Aortic Ring Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich, Serum pur, **c.** Serum:PBS 1:1, **d.** Serum:PBS 1:2, **e.** Serum:PBS 1:5, **f.** Serum:PBS 1:10, **g.** Serum:PBS 1:50, **h.** Serum:PBS 1:100, **i.** Serum:PBS 1:500, **j.** Serum:PBS 1:1000, (alle in 200x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

Im Tube Formation Assay der Serum Verdünnungen des männlichen Spenders (s Abb. 22) war zu sehen, dass die Anzahl an Tubes und Nodes mit zunehmender Serum Verdünnung stieg. Ihr Maximum erreichten Tubes und Nodes mit einer Verdünnung von 1:50, um bei weiterer Verdünnung des Serums wieder weniger zu werden.

Dieser treppenartige Anstieg an Tubes und Nodes in Abhängigkeit von der Verdünnung des Serums war im Fall des weiblichen Blutspenders nicht zu verzeichnen (s. Abb. 23). Vielmehr induzierten hier die Serumverdünnungen bis 1:10 eine eher geringe Ausbildung von Nodes und Tubes (jeweils weniger als 100 pro Well). Lag die Verdünnung aber im Bereich 1:50 bis 1:1000, so ließen sich Node- Anzahlen von 110-188 und Tube-Formationen von 162-252 beobachten.

VI. Ergebnisse

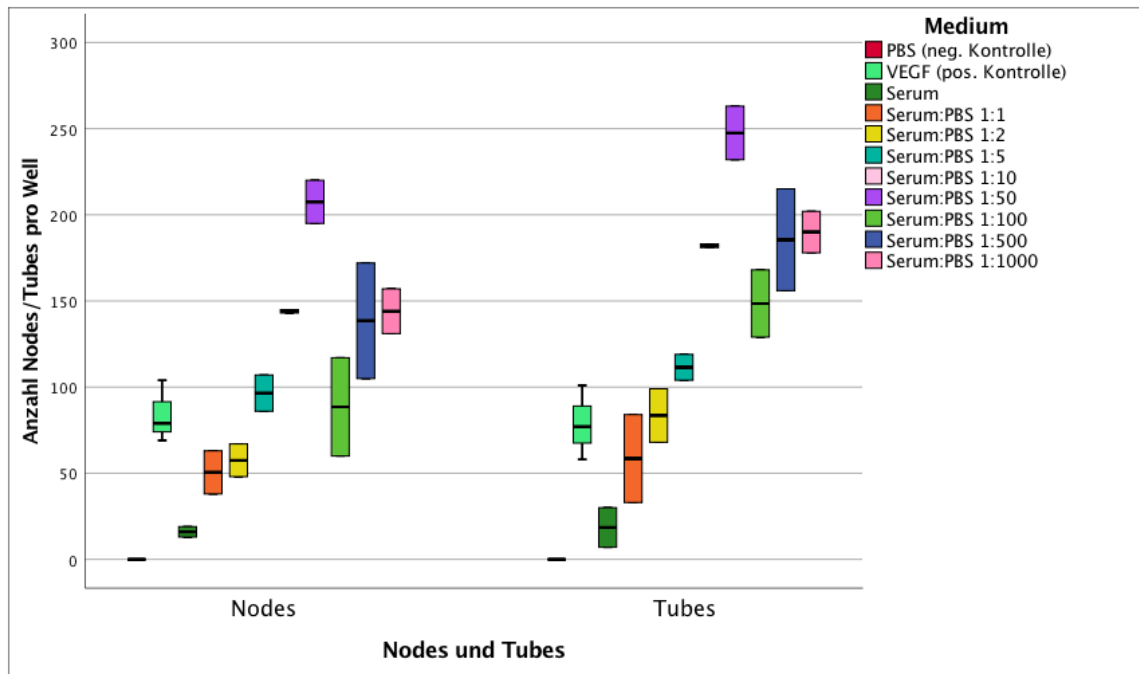


Abb. 22a: Tube Formation Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

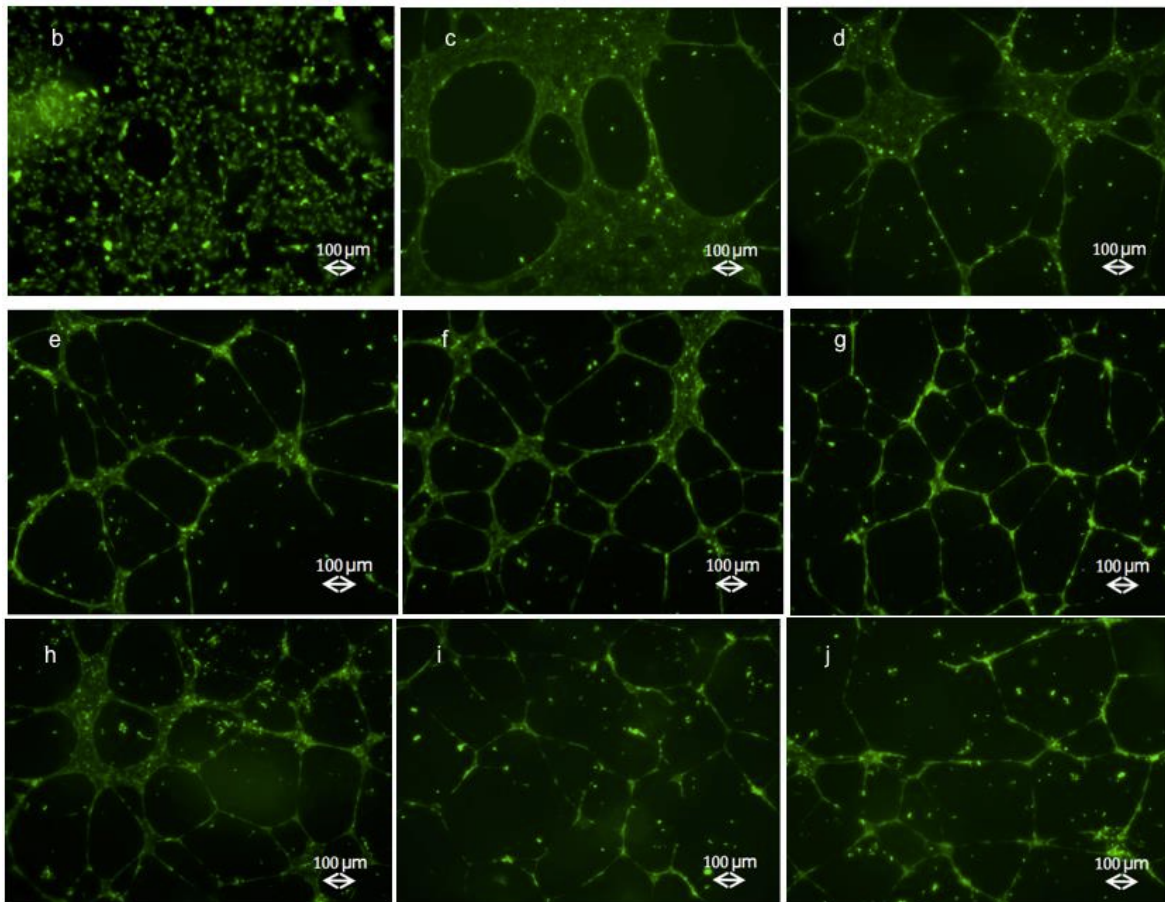


Abb. 22b: Tube Formation Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich, Serum pur, **c.** Serum:PBS 1:1, **d.** Serum:PBS 1:2, **e.** Serum:PBS 1:5, **f.** Serum:PBS 1:10, **g.** Serum:PBS 1:50, **h.** Serum:PBS 1:100, **i.** Serum:PBS 1:500, **j.** Serum:PBS 1:1000, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

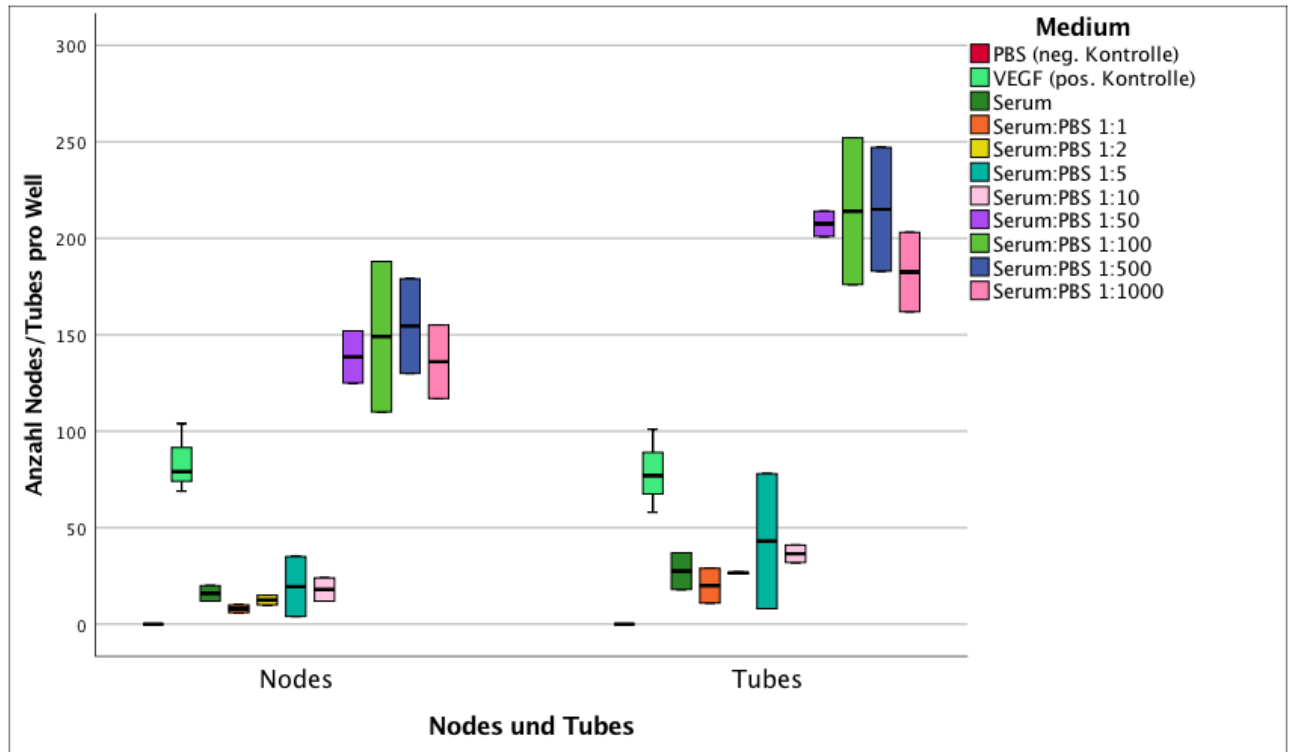


Abb. 23: Tube Formation Assay verdünnten Serums, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

C.4 Angiogenese unter verdünntem HPS

Im Aortic Ring Assay, welcher mit Verdünntem HPS inkubiert worden ist (s. Abb. 24) zeigte sich schon an Tag 3 eine verstärkte Gefäßinduktion unter HPS, welches 1:5 mit PBS verdünnt wurde. Die Anzahl an Gefäßen stieg bis zur Verdünnung 1:5 proportional mit der Verdünnung an und fiel von da an wieder ab.

An Tag 6 verhielt sich das Wachstumsmuster ähnlich, obgleich hier die HPS Verdünnungen 1:2 und 1:5 ein ähnlich starkes Gefäßwachstum generierten. Die Verdünnung 1:2 war signifikant stärker angiogen als die positiv Kontrollgruppe VEGF ($p=0,038$).

An Tag 8 verhielt sich die Angiogeneserate von unverdünntem HPS (2-176 Gefäße) sehr ähnlich zu dem von 1:5 verdünntem HPS (99-165 Gefäße), wenngleich das unverdünnte HPS eine starke Streuung der Gefäßanzahl aufwies.

VI. Ergebnisse

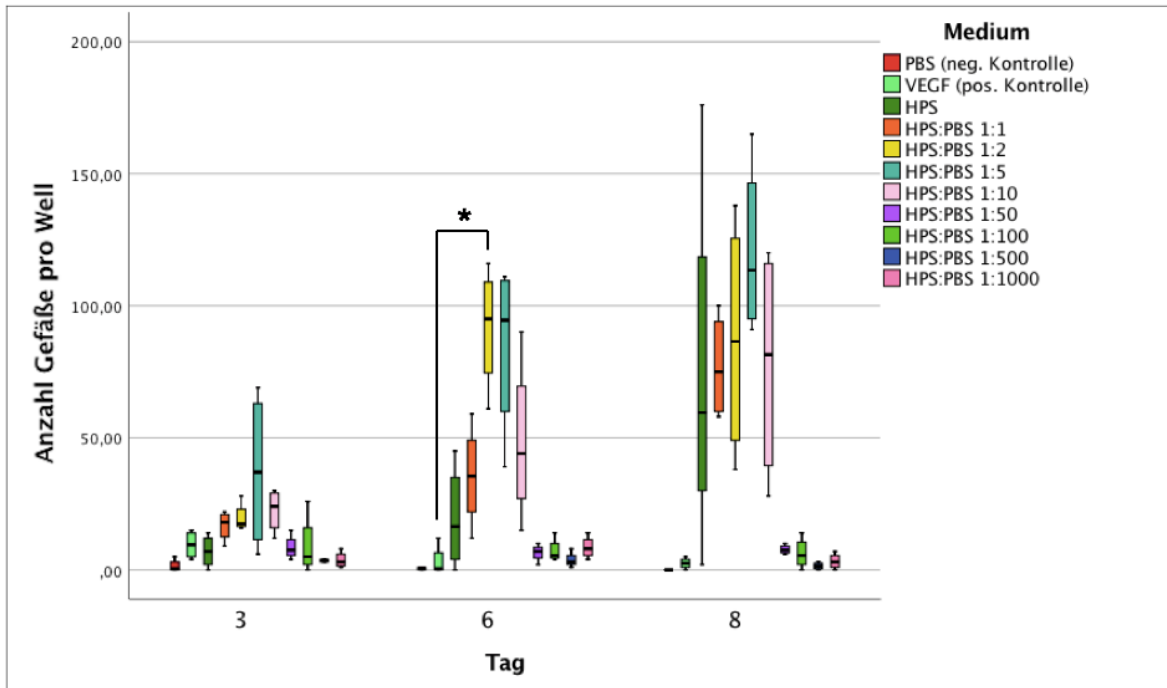


Abb. 24a: Aortic Ring Assay von verdünntem HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich, * = $p < 0,05$

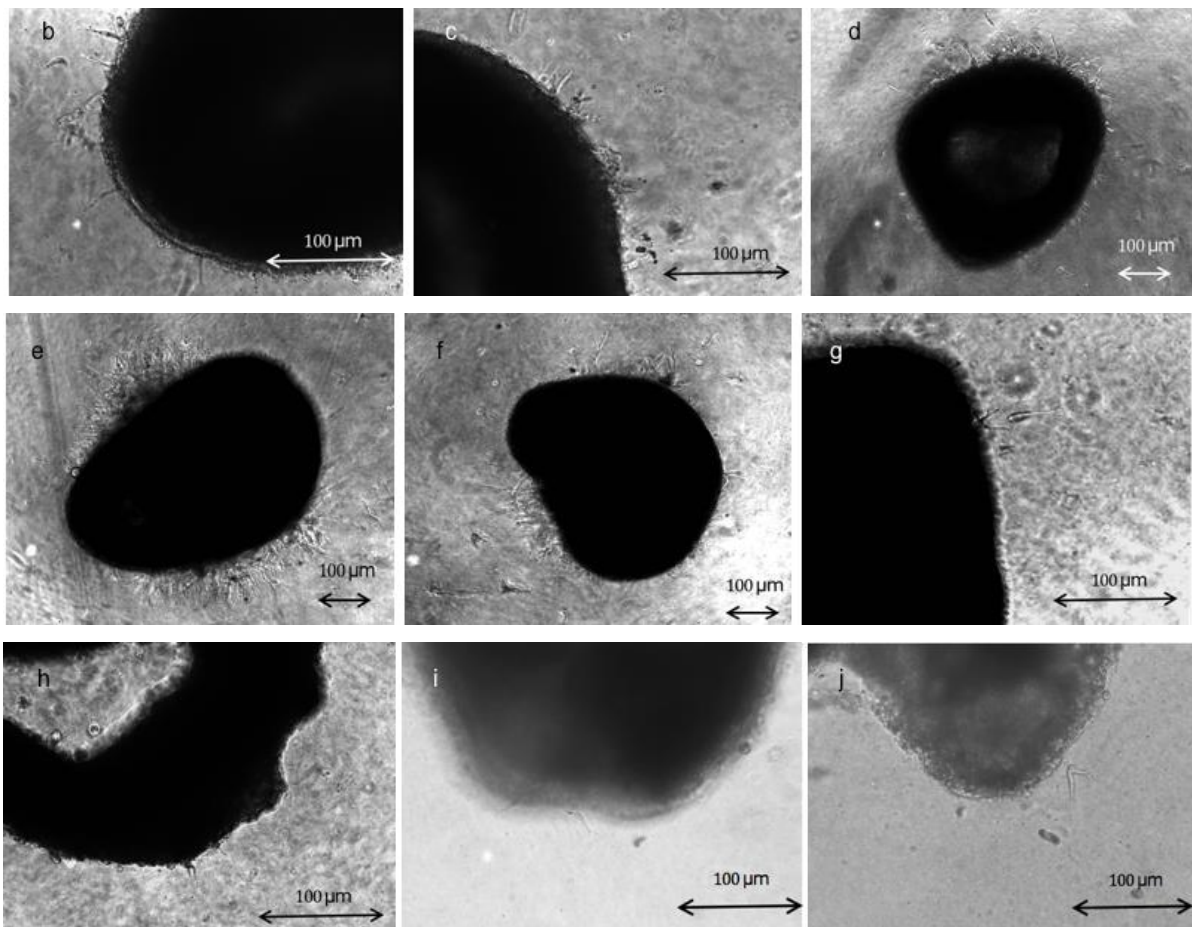


Abb. 24b: Aortic Ring Assay verdünnten HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich, HPS pur, **c.** HPS:PBS 1:1, **d.** HPS:PBS 1:2, **e.** HPS:PBS 1:5, **f.** HPS:PBS 1:10, **g.** HPS:PBS 1:50, **h.** HPS:PBS 1:100, **i.** HPS:PBS 1:500, **j.** HPS:PBS 1:1000, (a,b,d,e,i in 200x Vergrößerung, c,f,g,h in 100x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

Im Tube Formation Assay des verdünnten HPS (s. Abb. 25 und 26) war zu sehen, dass sowohl im Assay des männlichen, wie auch in dem des weiblichen Blutspenders die Anzahl an Tubes und Nodes mit zunehmender HPS Verdünnung stieg. Ihr Maximum erreichten Tubes und Nodes unter dem Einfluss von HPS, welches in einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:100 vorlag. Ab einer weiteren Verdünnung von 1:500 wurde eine deutlich schwächere Formation der HUVEC erreicht.

VI. Ergebnisse

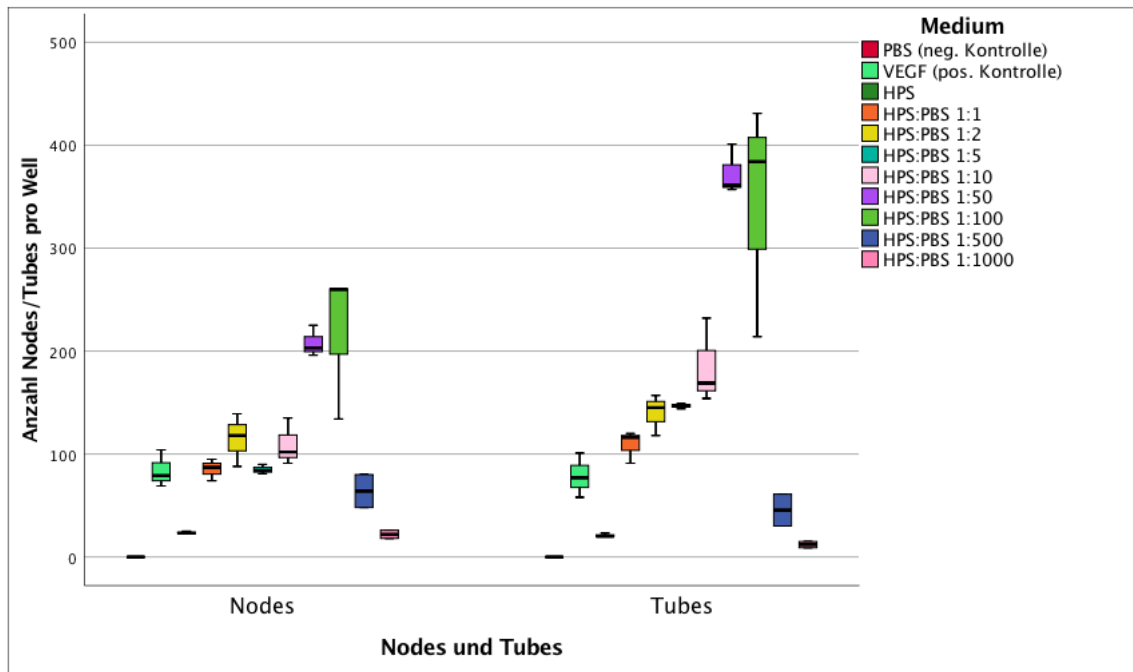


Abb. 25a: Tube Formation Assay von verdünntem HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

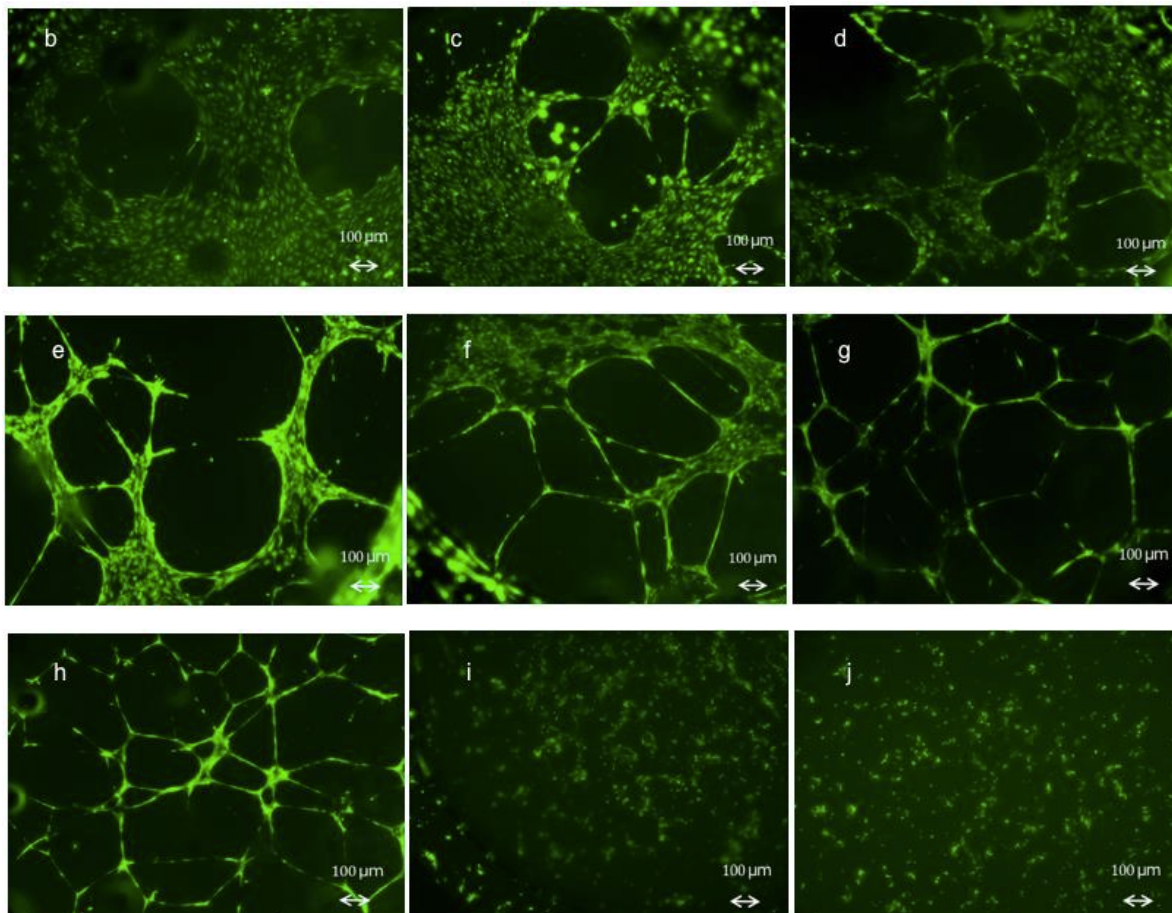


Abb. 25b: Tube Formation Assay verdünnten HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich, HPS pur, **c.** HPS:PBS 1:1, **d.** HPS:PBS 1:2, **e.** HPS:PBS 1:5, **f.** HPS:PBS 1:10, **g.** HPS:PBS 1:50, **h.** HPS:PBS 1:100, **i.** HPS:PBS 1:500, **j.** HPS:PBS 1:1000, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

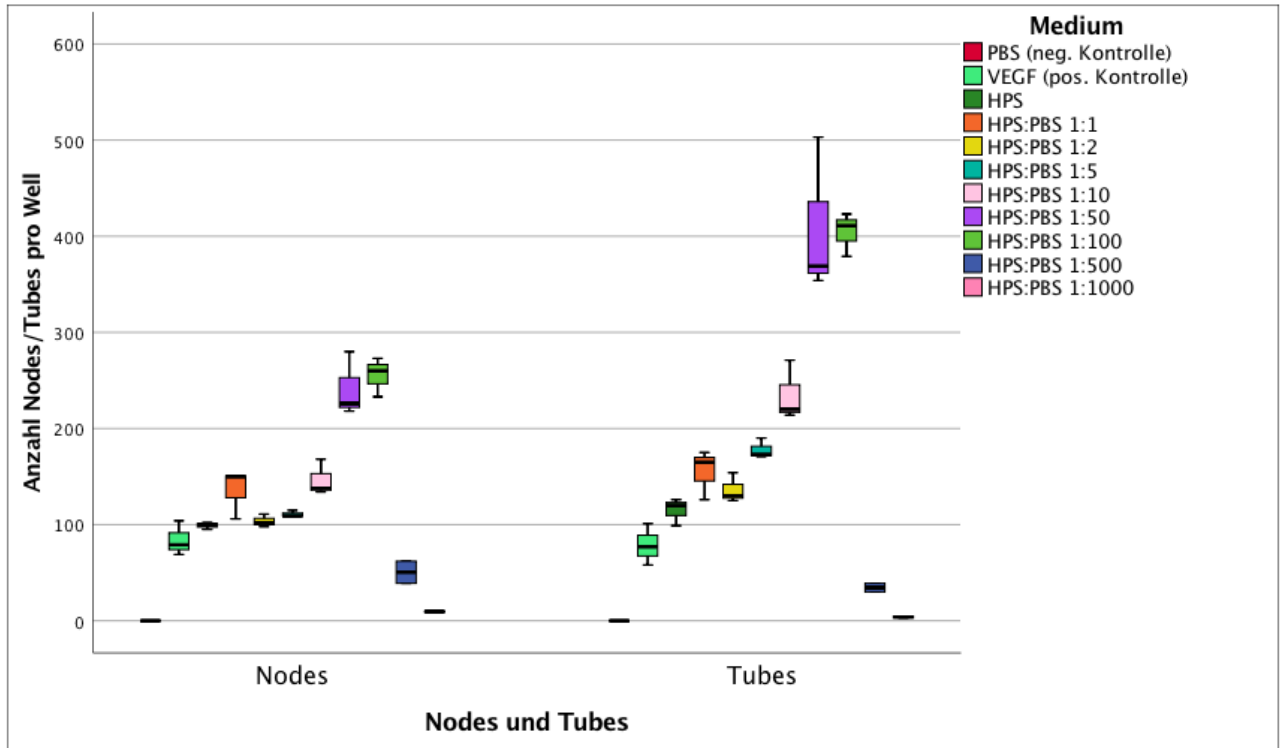


Abb. 26: Tube Formation Assay von verdünntem HPS, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

C.5 Angiogenese unter verdünntem PRP + CaCl

Die Verteilung von Nodes und Tubes in der Verdünnung von PRP mit Calciumchlorid unterscheidet sich zwischen den Blutproben des männlichen und des weiblichen Spenders.

Im Tube Formation Assay des männlichen Spenders (s. Abb. 27) wurde die meiste Node und Tube Formation durch eine PRP Verdünnung von 1:2 bis 1:50 generiert.

Was die PRP Verdünnungen des Spenderblutes des weiblichen Probanden betrifft, so formierten sich die HUVEC am stärksten unter Verdünnungen von 1:2 und 1:50 (s. Abb. 28).

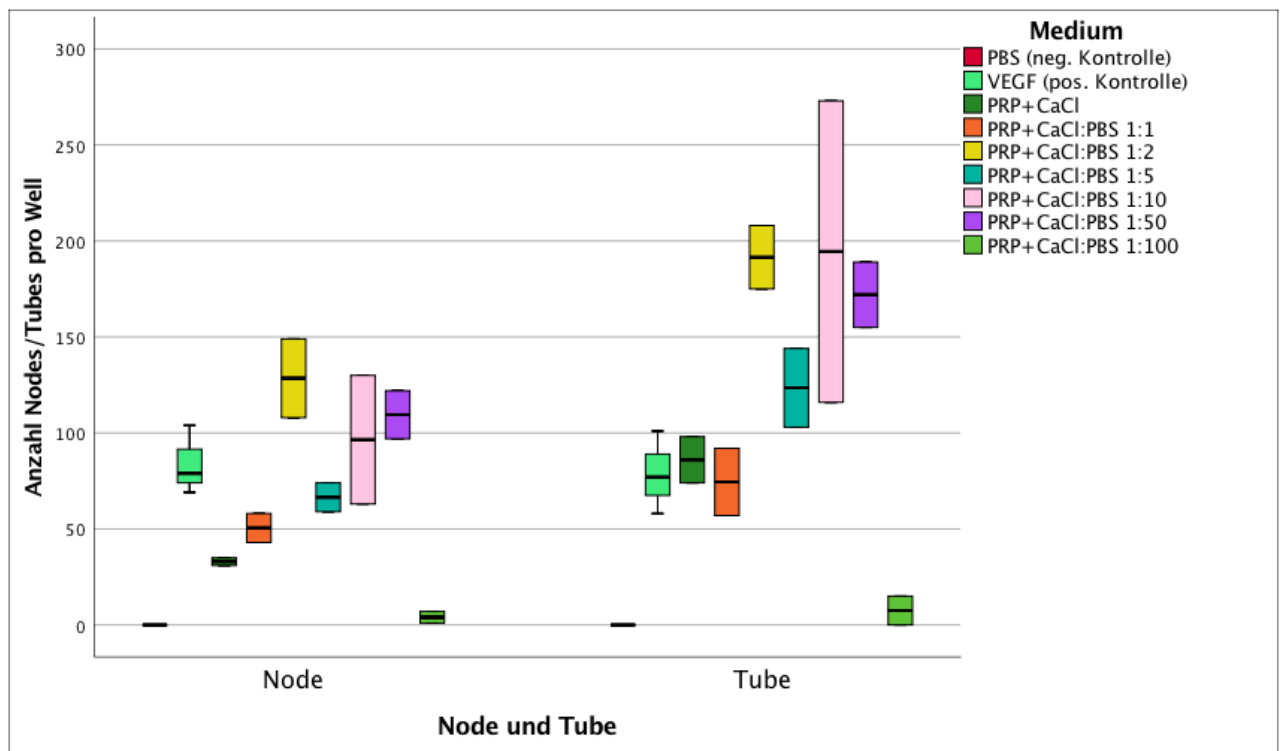


Abb. 27: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+CaCl, Blutspender 27 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

VI. Ergebnisse

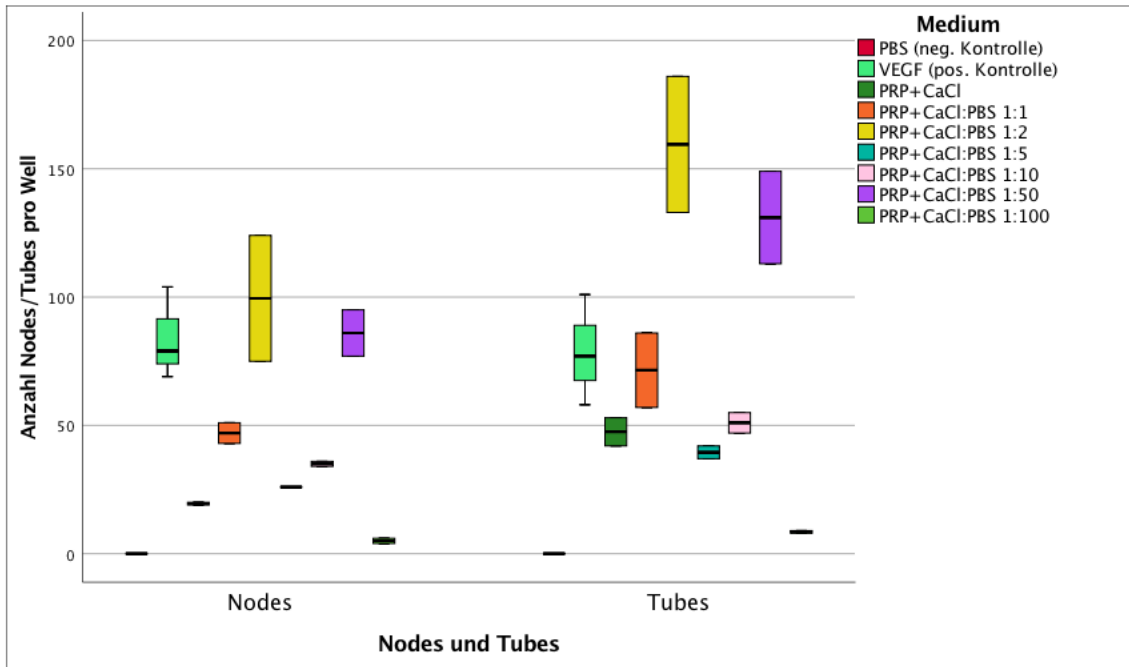


Abb. 28a: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+CaCl, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

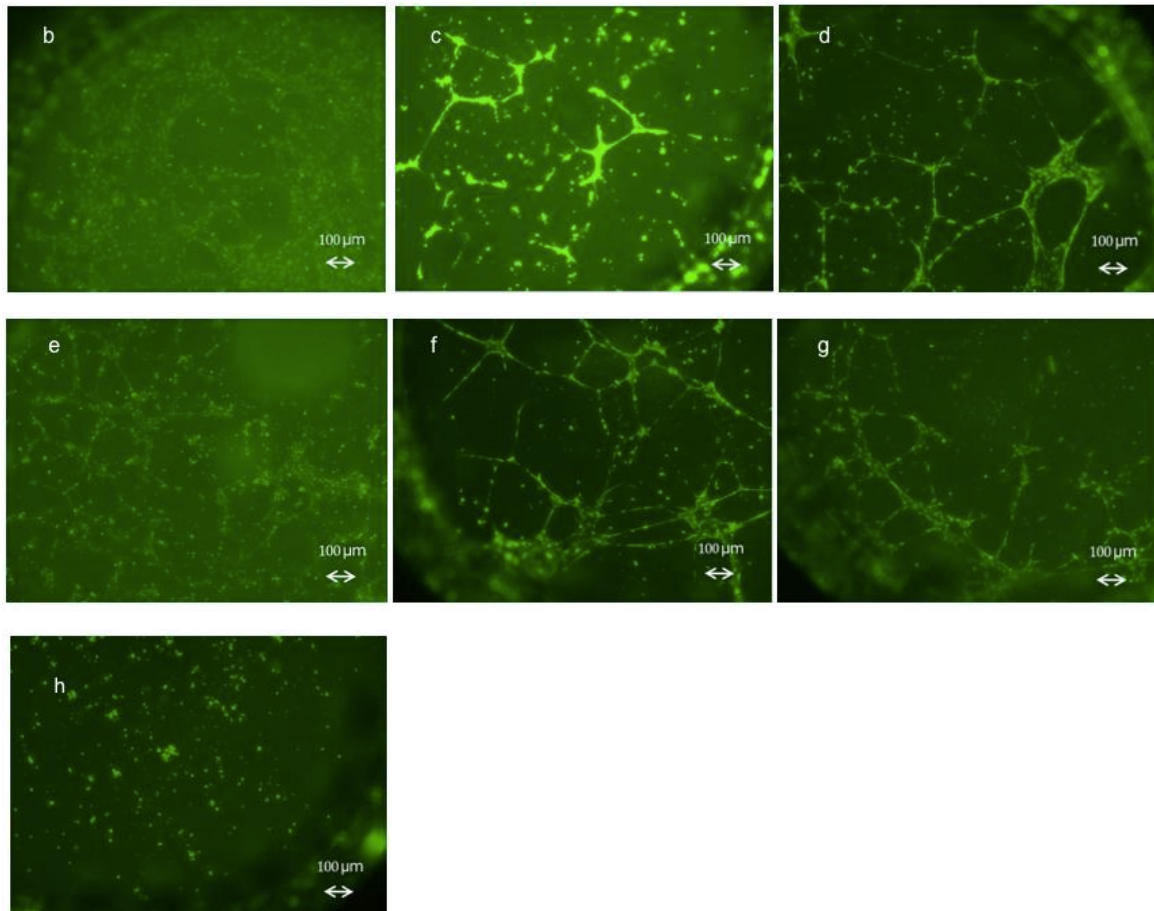


Abb. 28b: Tube Formation Assay verdünnten PRP+CaCl, Blutspender 23 Jahre, weiblich, PRP+CaCl pur, c. PRP+CaCl:PBS 1:1, d. PRP+CaCl:PBS 1:2, e. PRP+CaCl:PBS 1:5, f. PRP+CaCl:PBS 1:10, g. PRP+CaCl:PBS 1:50, h. PRP+CaCl:PBS 1:100, (alle in 50x Vergrößerung)

C.6 Angiogenese unter verdünntem PRP + Thrombin + CaCl

Auch in diesem Tube Formation Assay kam es zu Unterschieden zwischen den PRP Verdünnungen, welche durch Thrombin und Calciumchlorid aktiviert worden sind. In den Assays der beiden Blutspender induzierten die jeweiligen Verdünnungen die Node und Tube Formation unterschiedlich stark.

Im Assay des männlichen Blutspenders (s. Abb. 29) wurde durch PRP Verdünnungen von 1:2 bis 1:50 die stärkste Ausbildung von Nodes und Tubes beobachtet, wobei diese ihre maximale Ausprägung unter der Verdünnung 1:50 fanden.

Im Assay des weiblichen Spenders hingegen (s. Abb. 30) war das Node und Tube Maximum ebenfalls unter 1:50 verdünntem PRP registriert worden, hier waren die Ergebnisse des unverdünnten PRP jedoch die zweitstärksten.

VI. Ergebnisse

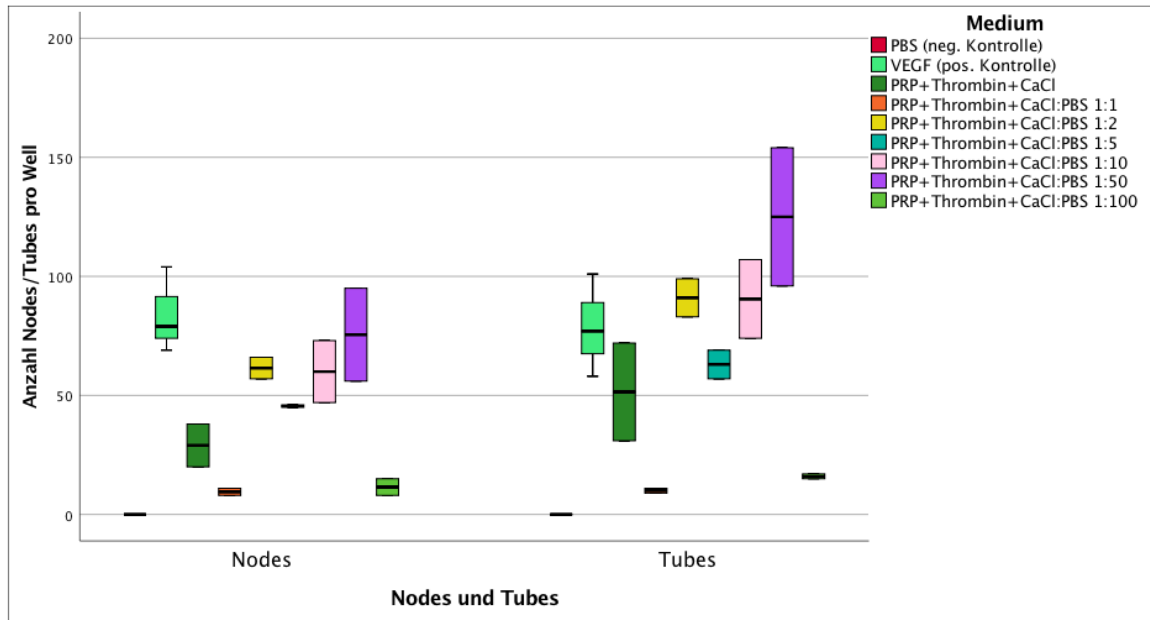


Abb. 29a: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+Thrombin+CaCl, Blutspender 27 Jahre, männlich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

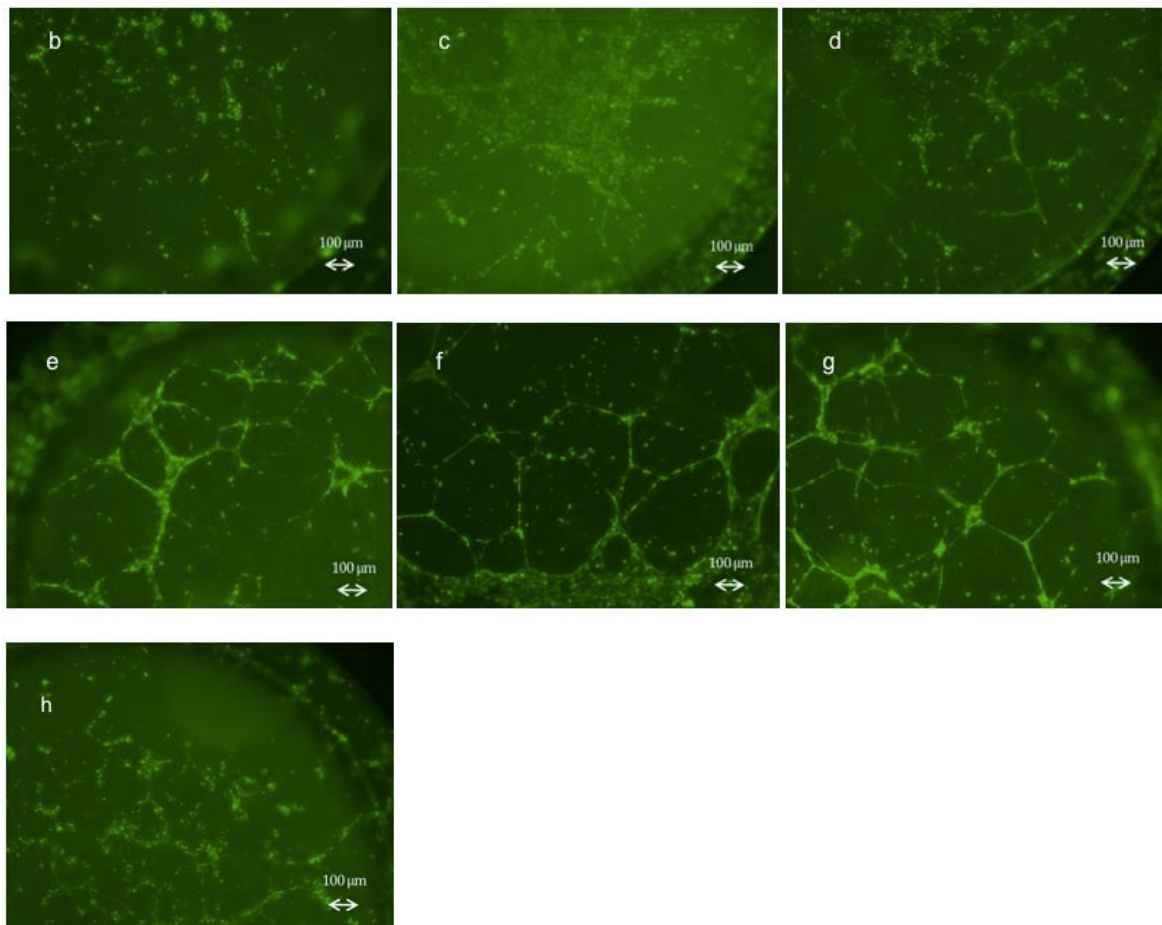


Abb. 29b: Tube Formation Assay verdünnten PRP+Thrombin+CaCl, Blutspender 27 Jahre, männlich, PRP+Thrombin +CaCl pur, **c.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:1, **d.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:2, **e.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:5, **f.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:10, **g.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:50, **h.** PRP+Thrombin +CaCl:PBS 1:100, (alle in 50x Vergrößerung)

VI. Ergebnisse

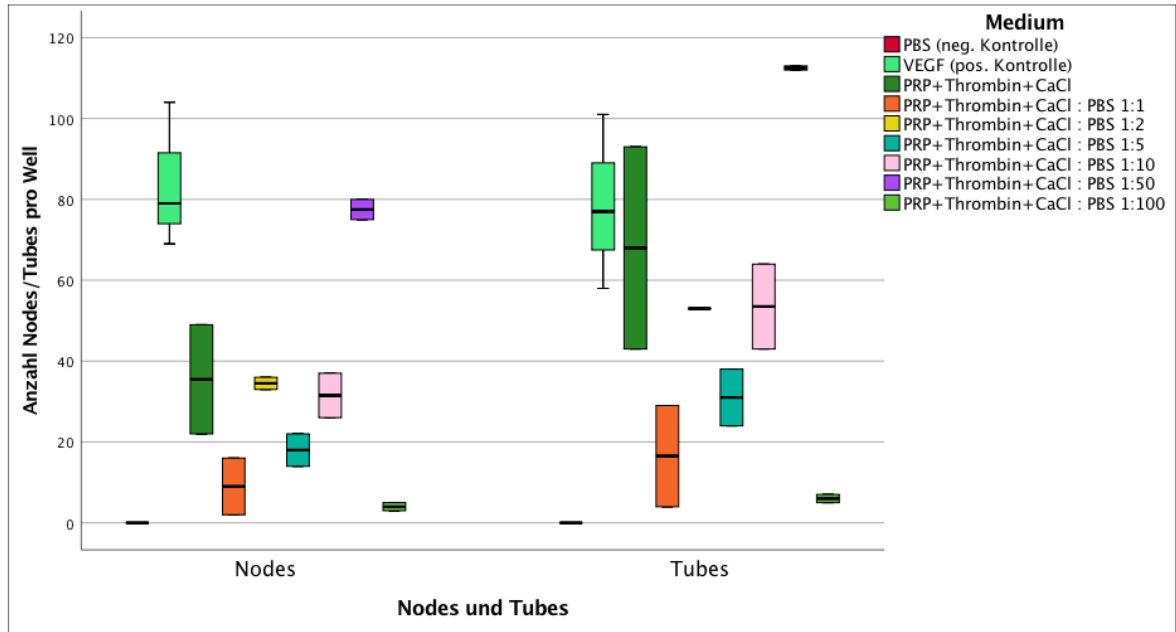


Abb. 30: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+Thrombin+CaCl, Blutspender 23 Jahre, weiblich. Wachstum nach 16 Stunden Inkubation.

VII. Diskussion

A. Material und Methoden

Zur quantitativen Untersuchung der angiogenen Wirkung verschiedener Blutprodukte wurde in dieser Arbeit der Nachweis mittels Aortic Ring Assay (ARA) sowie der Tube Formation Assay (TFA) gewählt.

In dieser Arbeit wurden PBZs einer hypoxischen extrakorporalen Inkubation ausgesetzt, um eine Wundumgebung zu simulieren, auf welche die Zellen auf natürliche Weise mit der Produktion parakriner Proteine reagierten. Ihr Releasate ist daher reich an parakrinen Proteinen, die die endotheliale Zellmigration und das Wachstum von neuen Gefäßen stimulieren und regulieren (Hadjipanayi et al., 2013; Hadjipanayi & Schilling, 2013). Im Gegensatz zu exogen zugeführten Wachstumsfaktoren entsteht bei der zellvermittelten Angiogenese ein deutlich robusteres und funktionsfähigeres Gefäßnetzwerk (Levenberg et al., 2005; Phelps & Garcia, 2009; Sieveking & Ng, 2009).

Eine der größten Herausforderungen in der Angiogeneseforschung besteht darin, eine geeignete Methode zur Darstellung des Gefäßwachstums zu finden. *In vitro* Assays sind zwar per se von Nutzen, um spezifische Vorgänge darzustellen, können aber nicht den gesamten Angiogenese Hergang allumfassend abbilden. Dies ist vor allem der schiereren Komplexität *von in vivo* Vorgängen geschuldet (R. Auerbach, Akhtar, Lewis, & Shinnars, 2000; Vailhe et al., 2001).

Aus physiologischer Sicht sollte ein ideales *in vitro* Modell der Angiogenese multiple Kriterien erfüllen. Es sollte im Allgemeinen alle Grundpfeiler des Gefäßneuwachstums aufweisen, angefangen bei der Lösung der Endothelzellen von der Gefäßwand bis hin zur Bildung von Tubes, deren Reifung und Formation zu einem funktionierendem Gefäßnetzwerk (Vailhe et al., 2001). Zudem sollte es kosteneffizient, schnell und einfach durchführbar, reproduzierbar und zuverlässig sein (Jain, Schlenger, Hockel, & Yuan, 1997). Je nachdem, wie sich die Zellen reorganisieren, können Angiogenese Assays in zwei Kategorien unterteilt werden: Zum einen solche, die sich zweidimensional darstellen (die Zellen entwickeln plan auf der Oberfläche eines Substrates tubuläre Strukturen) und Assays, in welchen die Zellmigration dreidimensional verläuft (die Zellen dringen in die umgebende extrazelluläre Matrix ein) (Vailhe et al., 2001).

VII. Diskussion

Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle eignen sich laut Literatur dazu, die grundlegenden Mechanismen der Angiogenese zu untersuchen, sowie pro- und antiangiogene Effekte in einer komplexen Kaskade zellulärer und molekularer Ereignisse zu analysieren (Aplin et al., 2008). Trotzdem stoßen auch sie beim Versuch physiologische Vorgänge zu imitieren an ihre Grenzen, wie im Folgenden verdeutlicht wird.

A.1 Aortic Ring Assay

Die Besonderheit des ARA beruht dabei vor allem darauf, dass im Gegensatz zu vielen bekannten Nachweisverfahren der Assay nicht auf Endothelzellen in einem Kulturmedium basiert, sondern ein ganzes Organ dreidimensional kultiviert wird (Bellacen & Lewis, 2009; Goodwin, 2007).

Hierbei kann beobachtet werden, wie Gefäßstrukturen aus Segmenten der Aorta in Richtung Peripherie wachsen und Neovessels die extrazelluläre Membran durchdringen, was physiologischen und pathologischen Vorgängen im adulten Organismus sehr nahe kommt. Die Offenlegung der luminalen Gefäßoberfläche führt somit zur endothelialen Reorganisation und zum Sprouting (Nicosia, 2009). Um die Invasion der Gefäßstrukturen zu ermöglichen, ist beim Versuchsaufbau auf die Konsistenz des Matrigels™ zu achten. Da es sich bei dem Gel um eine polymere Substanz handelt (Ferrenq, Tranqui, Vailhe, Gumery, & Tracqui, 1997), muss eine Dichte erreicht werden, die es zwar Endothelzellen erlaubt, zu migrieren, jedoch ein Absinken des Aortenringes verhindert. Zu diesem Zweck wurde das Matrigel™ in einem Verhältnis von 1:6 mit DMEM w/o Phenol (Life Technologies, Germany) gemischt und die Well Platten damit gecoatet. Die vom Aortenring ausgehenden Neovessels sind bemerkenswerterweise anatomisch identisch zu *in vivo* Formationen, in welchen sich Perizyten und glatte Muskelzellen den Endothelzellen anlagern (Nicosia, Bonanno, & Villaschi, 1992; Nicosia & Villaschi, 1995).

Ein Vorteil des ARA gegenüber Zellassays ist die Möglichkeit, nicht nur einzelne Zelllinien wie das Endothel anzusprechen, sondern auch intravaskuläre Schichten unterhalb des Endothels zu erreichen, welche an der Angiogenese beteiligt sind (R. Auerbach et al., 2000). Kritisch sehe ich hierbei den Unterschied zum physiologischen Gefäßwandaufbau. Hierbei erreichen die Blutzellen zwar direkt das Endothel, nicht jedoch die darunter gelegenen Zellschichten. Andererseits verändert sich im ARA die Bioverfügbarkeit von angiogenen Faktoren durch das dreidimensionale Setting (Vailhe et al., 2001). Die Distanz zwischen Aortenring und den Blutprodukten generiert einen Diffusionsgradienten für Nährstoffe, Sauerstoff und stimulierende Faktoren, wie es auch im lebendigen Organismus der Fall ist (Vailhe et al., 2001).

Dies ist ein möglicher Grund dafür, weshalb die Ergebnisse zwischen ARA und TFA teils differieren.

VII. Diskussion

Doch nicht nur exogen zugeführte Wachstumsfaktoren sorgen für eine endotheliale Aussprossung aus den Aortenringen. In den Jahren 1989/1990 konnten die Arbeitsgruppen um Kawasaki und Nicosia nachweisen, dass allein schon die mechanische Reizung der Aortenringe durch ihre Präparation dazu führt, dass ein endogener Mechanismus angestoßen wird, der das Gefäßwachstum begünstigt (Kawasaki, Mori, & Awai, 1989; Nicosia & Ottinetti, 1990). Dies ist eine mögliche Erklärung für das Paradoxon, dass auch in der Negativkontrolle AIM im ARA ein Vessel Sprouting zu verzeichnen war, im Tube Formation Assay eine solche Response jedoch ausblieb. Bei der Aortenpräparation werden durch Zellen in der Gefäßwand endogene angiogene Faktoren, inflammatorische Zytokine, Chemokine, extrazelluläre Matrixmoleküle, sowie proteolytische Enzyme produziert, die die aortale Angiogenese indizieren (Nicosia, Zorzi, Ligresti, Morishita, & Aplin, 2011). Damit diese basale Zellaktivität so weit wie möglich unterdrückt wird, wurde unmittelbar im Anschluss an die Aortenentnahme aus dem Organismus ein Wachstumsstillstand mittels opti-MEM® Reduced Serum eingeleitet.

Ein weiterer Kritikpunkt des ARA ist die Änderung der Wachstumsbedingungen zwischen der Organexplantation und der Kultivierung im Matrigel™, das fortan der Imitation der extrazellulären Matrix dient (R. Auerbach et al., 2000). Zudem besteht in der entnommenen Aorta kein Blutfluss mehr, was dazu führt, dass keine mechano-chemischen Signale mehr generiert werden, die im lebenden Organismus das Gefäßwachstum unterstützen würden (Nicosia et al., 2011).

Des Weiteren gilt es zu beachten, dass das Gefäßwachstum physiologischerweise vorrangig von Mikrogefäßen ausgeht und nicht von Hauptgefäßen wie der Aorta (Bellacén & Lewis, 2009; Goodwin, 2007). Davon abgesehen muss berücksichtigt werden, dass die große Zahl an Aortenringen von mehreren Spendertieren stammt. Außer Acht bleibt, dass unterschiedliche Aorten bzw. Mäuse auch unterschiedlich ausgeprägt auf Wachstumsfaktoren ansprechen und die Gefäßantwort von „angiogen potenteren“ Mäusen von anderen Individuen abweicht (Bellacén & Lewis, 2009; Zhu, Iurlaro, MacIntyre, Fogel, & Nicosia, 2003). Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden daher die Aortenringe aller Mäuse gleichmäßig auf die zu testenden Medien verteilt.

Schlussendlich erweist sich der Vorteil des dreidimensionalen Wachstums als hinderlich im Hinblick auf die Quantifizierung des Gefäßwachstums (Bellacén & Lewis,

VII. Diskussion

2009). Es erfordert oftmals das gründliche Absuchen auf Gefäßstrukturen in mehreren mikroskopischen Ebenen, sowie die damit verbundene Aufnahme mehrerer Fotos. Wie in Abb. 6.a. und 6.b. deutlich wird, muss darüber hinaus akkurat zwischen „echten“ proliferierten Gefäßen und Fibroblasten ähnlichen Strukturen unterschieden werden. Zeitlich geht dem Vessel Sprouting die Migration von Makrophagen der Adventitia und Fibroblasten nach abluminal voraus (Nicosia et al., 2011). Diese Strukturen seien laut Literatur ab dem ersten bis zweiten Tag nach Ansetzen der Kultur identifizierbar (Nicosia et al., 2011). Dies ließ sich auch in den vorliegenden Versuchsreihen bestätigen. Obwohl die biologische Bedeutung dieser Strukturen bisher unklar ist, besteht die Vermutung, dass sie dem Endothel als eine Art Leitstruktur beim Sprouting nach abluminal dienen könnten (Nicosia et al., 2011). In der Literatur ist ebenso beschrieben, dass Fibroblasten eine zentrale Rolle in der Kontraktion der extrazellulären Matrix zukommt (Majno, Gabbiani, Hirschel, Ryan, & Statkov, 1971), was meiner Meinung nach durchaus sein kann, da bei Ansetzen der ARAs ausnahmslos alle Aortenlumina einzusehen waren, einige Aortenringe sich jedoch mit Dauer des Versuchs zusammenzogen und sich verdrehten.

Letztendlich sind die Vorgänge im ARA keine exakte Kopie der natürlichen Angiogenese. Allerdings stellt dieses Organmodell eine Methode dar, den mehrschrittigen Angiogeneseprozess zufriedenstellend zu rekapitulieren (Vailhe et al., 2001). Seine Durchführung ist zur Quantifizierung und Bewertung angiogener und angiostatischer Faktoren wenig komplex und kostengünstig (Nissanov, Tuman, Gruver, & Fortunato, 1995; Vailhe et al., 2001).

A.2 Tube Formation Assay

Im Versuchsaufbau dieser Arbeit wurden bei der Wahl der Endothelzellen HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) für *in vitro* Angiogenese Assays verwendet (Fox, 2001). Ein Grund hierfür ist, dass diese schnell zu beschaffen, einfach zu isolieren und leicht zu kultivieren sind (Nakatsu & Hughes, 2008). Der Assay beruht auf der Tatsache, dass HUVECs sich unter dem Einfluss parakriner Proteine zu kapillarähnlichen Strukturen (CLS) formieren, wenn sie in geringer Dichte auf Matrigel™ kultiviert werden (Arnaoutova et al., 2009; Arnaoutova & Kleinman, 2010; Kubota et al., 1988).

VII. Diskussion

Der Gebrauch von Endothelzellen zum Nachweis von Angiogenese ist der in der Literatur am häufigsten angewendete (AlMalki, Shahid, Mehdi, & Hafeez, 2014; DeCicco-Skinner et al., 2014).

Der Tube Formation Assay wurde erstmals 1988 beschrieben. Folglich existiert für diesen Versuchsaufbau ein großer Literaturschatz, welcher belegt, dass sich HUVECs in diversen Assays ähnlich zu Endothelzellen verhalten, die aus anderen Gefäßen stammen (Nakatsu & Hughes, 2008).

Ein Vorteil bei der Durchführung des Tube Formation Assays ist, dass er wenig Zeit erfordert und mehrere Tests parallel durchgeführt werden können, was sich bei aufwändigen *in vivo* Studien als organisatorisch schwierig gestaltet (DeCicco-Skinner et al., 2014). Zudem ist die Methodik leicht zu erlernen und auch die Auswertung zeigt sich aufgrund der Zweidimensionalität des Tube Formation Assays als leicht reproduzierbar (Goodwin, 2007). Nicht zuletzt erfordert der TFA auch einen bedeutend geringeren finanziellen Aufwand, als es bei *in vivo* Tests der Fall wäre (R. Auerbach et al., 2000).

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten Zellen zwischen der zweiten und sechsten Passage verwendet werden (DeCicco-Skinner et al., 2014). Des Weiteren ist darauf zu achten, dass eine Zellanzahl von 1×10^6 Zellen / ml eingehalten wird. Bei einer zu geringen Zelldichte im Assay bestünde die Gefahr, dass nur eine gering ausgeprägte oder gar keine Tube Formation stattfindet (DeCicco-Skinner et al., 2014). Andererseits führt eine zu große Zellzahl zur Ausbildung eines Monolayers oder Verklumpung (DeCicco-Skinner et al., 2014).

Eine Limitation in der Ableitung von endothelialen *in vitro* Assays auf *in vivo* Vorgänge zielt auf das Wachstumsverhalten der Endothelzellen ab. Physiologischerweise handelt es sich bei ihnen um Zellen mit einer der niedrigsten Proliferationsraten im gesamten Organismus, wenn man ihre Aktivierung durch den Ovarialzyklus, Schwangerschaften oder in Wunden ausnimmt (Denekamp, 1999). Hinzu kommt eine breite Heterogenität unter Endothelzellen. Hierbei sind mikrovaskuläre Endothelzellen an der Angiogenese maßgeblich beteiligt. Sie variieren zwischen einzelnen Organen, einzelnen Gefäßen dieser Organe oder sogar innerhalb individueller Gefäße (Gumkowski, Kaminska, Kaminski, Morrissey, & Auerbach, 1987; Plendl, Neumuller, Vollmar, Auerbach, & Sinowatz, 1996). Je nach Herkunftsort der jeweiligen Zellen erfolgen daher unterschiedlich starke Antworten auf Wachstumsreize und Inhibitoren (R. Auerbach, 1991; Robert Auerbach & Joseph, 1984; Gumkowski et al., 1987). So

VII. Diskussion

exprimieren Endothelzellen des Gehirns spezifische Antigene und synthetisieren γ -Glutamyltransferase (Yu & Auerbach, 1999). Andererseits zeigen primitive und Tumor-induzierte Gefäße eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und spezifischen Integrinrezeptoren und selbst innerhalb verschiedener Tumorarten wurde eine organspezifische Anhaftung nachgewiesen (Alby & Auerbach, 1984; Robert Auerbach & Joseph, 1984; Madri, Pratt, & Tucker, 1988; Zetter, 1990). Des Weiteren produzieren unterschiedliche Endothelzellen verschiedene Zytokine, die sowohl pro- als auch antiangiogen wirken (R. Auerbach et al., 2000).

Eine weitere Besonderheit dieser Zellen ist ihre Störanfälligkeit in Zellkulturen, während sie *in vivo* äußerst langlebig sind (R. Auerbach et al., 2000). So wirken geringste Schwankungen im pH-Wert oder der Osmolarität zytotoxisch (R. Auerbach et al., 2000). Daher besteht das Risiko, dass im Assay vermeintlich angiostatische Reagenzien das Zellwachstum hemmen und die Migration unterbinden, aber selbige *in vivo* wirkungslos bleiben (R. Auerbach et al., 2000). Außerdem existiert eine große Anzahl an zytotoxischen Substanzen, die nicht spezifisch auf Endothelzellen wirken und somit wenig selektiven Einfluss auf die Angiogenese nehmen (R. Auerbach et al., 2000).

Bei der Durchführung des TFA sollte beachtet werden, dass dieser Kulturansatz nur in der Lage ist, bestimmte Schritte der Angiogenese, wie der Morphogenese, widerzuspiegeln und die Proliferation der Endothelzellen nicht berücksichtigt wird, da die dritte Dimension der Darstellung fehlt (Goodwin, 2007; Vailhe et al., 2001). Aus diesem Grund deklarierten Vernon und Sage 1995 die Rolle des zweidimensionalen Assays als repräsentativ für nur die Non-Sprouting Angiogenese/ Intussusception (Vernon & Sage, 1995). Wie jeder Assay kann auch dieser Schwächen aufweisen. Unter allen zweidimensionalen Modellen wird diese auf Matrigel™ basierende Endothelkultur jedoch als einzige gesehen, die standardisiert genug ist, um dem Vergleich mit dreidimensionalen Versuchen standzuhalten (Vailhe et al., 2001).

Letztendlich verschaffen sowohl der Aortic Ring Assay als auch der Tube Formation Assay einen vielversprechenden ersten Überblick über das angiogene Potential verschiedener getesteter Blutprodukte. Aufgrund der komplexen Natur der vaskulären Prozesse zwischen dem Gefäß, seiner Matrix und dem Gesamtorganismus, sollte der *in vitro* Testung jedoch zur Validierung zwangsläufig eine *in vivo* Studie folgen (Goodwin, 2007; Patan, 2004).

B. Steigerung des angiogenen Potentials durch Hypoxie

In dieser Studie wurden PBCs hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt, um die Produktion angiogener Faktoren zu initiieren. Verschiedene in der Literatur beschriebene *in vitro* Studien zeigten bereits einen Einfluss des Sauerstoffgradienten auf die Freisetzung parakriner Proteine (Cheema, Brown, Alp, & MacRobert, 2008).

Wie hypoxische Verhältnisse die Angiogenese stimulieren, wurde bereits in der Einleitung anhand des Transkriptionsfaktors HIF-1 α erläutert.

Paradoxerweise kommt es bei Krankheiten mit chronischer Ischämie, wie es bei Diabetes mellitus oder der pAVK der Fall ist, zu einer stark eingeschränkten adaptiven Angiogenese in chronischen Wunden (van Weel et al., 2007). Interessant ist hierbei, dass sich diese Limitierung primär auf die Extremitäten bezieht, während die Fähigkeit der Gefäßneubildung in anderen Geweben desselben Patienten erhalten bleibt (Hadjipanayi & Schilling, 2013). In der Literatur gilt dahingehend die Annahme, dass periphere Blutzellen (PBCs) aufgrund wiederholter oder verlängerter hypoxischer Episoden die Fähigkeit einbüßen, mit einer Hochregulation HIF-1 α gesteuerter angiogener Wachstumsfaktoren zu reagieren (Hadjipanayi et al., 2012; Levy, 1999; Pichiule & LaManna, 2002; van Weel et al., 2007; A. Yamamoto et al., 2008; Yuan, Li, Pitera, Long, & Woolf, 2003). In einer Studie von 2007 verglichen Van Weel et al. die Expression von VEGF und weiteren Angiogenesefaktoren in den amputierten muskel-ischämischen Gliedmaßen von 16 pAVK-Patienten mit nicht-ischämischen Muskeln von Patienten, die an chronischer Ischämie litten (van Weel et al., 2007). Es zeigte sich in den muskel-ischämischen Gliedmaßen eine stark verminderte Genexpression von angiogenen Wachstumsfaktoren (van Weel et al., 2007). Lediglich akut ischämisches Gewebe wies eine erhöhte Expression von HIF-1 α -abhängigen Genen auf (van Weel et al., 2007). Dies untermauert die Hypothese, dass kurzzeitig einwirkende Hypoxie zwar die Ausschüttung angiogener Faktoren hochreguliert, diese aber unter chronischem Sauerstoffmangel heruntergefahren werden (Hadjipanayi & Schilling, 2013).

C. Vergleich der Angiogeneseinduktion zwischen PRP und hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten

Die Tatsache, dass periphere Blutzellen (PBZs) im Überfluss vorhanden und leicht zu extrahieren sind, macht diese zum idealen Zellmaterial für autologe Angiogenesetherapien, z.B. in der Wundheilung, da sie sofort gebrauchsfertig sind und eine lange Kultivierung nicht nötig ist (Hadjipanayi et al., 2013). Wenn es somit möglich wäre, das chronisch ischämische Gewebe mit der gesamten Bandbreite an Angiogenesefaktoren zu versorgen, die normalerweise vorhanden sind, ermöglichte dies eine erneute adaptive Angiogenese (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Zudem könnte der Einsatz hypoxisch präkonditionierter Sekretome die Durchblutung von autologen Transplantaten (Haut-, Fett-, Muskel-, oder Knochentransplantate) verbessern und damit ihre Einheilungszeit verkürzen (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Da es sich bei PBZs um patienteneigene Zellen handelt ist das Risiko immunologischer Abstoßungsreaktionen oder Entzündungen sehr gering (Hadjipanayi et al., 2013). Man kann hierbei folglich von einer individuellen, eigens auf den Patienten zugeschnittenen angiogenen Therapie sprechen (Hadjipanayi et al., 2013; Ozturk et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde Vollblut mit und ohne Gerinnungshemmer über 4 Tage bei 37°C (der physiologischen Körpertemperatur) und unter physiologischer Hypoxie bei 1-5% Sauerstoff gelagert (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Aus dem Überstand des Vollblutes entstand Hypoxia preconditioned Plasma (HPP) und aus dem Überstand des antikoagulierten Blutes Hypoxia preconditioned Serum (HPS). Weitere entscheidende Faktoren sind die Wahl des verwendeten Antikoagulans bzw. Koagulans. In dieser Arbeit wurde sich für Citrat als Antikoagulans entschieden, da dieses die Membran der Blutplättchen nicht beeinflusst und die Antikoagulation einfach durch Beigabe von Calciumchlorid aufgehoben werden kann (Anitua, 1999; Landesberg, Roy, & Glickman, 2000). Zwar wurde in einer zweiten Untersuchungsgruppe PRP mit Calciumchlorid und Thrombin aktiviert, hinsichtlich der klinischen Anwendung sei jedoch erwähnt, dass der Gebrauch von bovinem Thrombin das potenzielle Risiko einer Koagulopathie birgt (Cmolik, Spero, Magovern, & Clark, 1993; Landesberg et al., 2000; Spero, 1993). Zudem ist beim Gebrauch von Citrat der Anteil an vorzeitig aktivierten Plättchen bei der Blutgewinnung geringer als beispielsweise bei EDTA-

VII. Diskussion

Antikoagulation (Efeoglu et al., 2004). Meine erbrachten Ergebnisse im Abschnitt V.A zeigen letztendlich keine Überlegenheit des PRP gegenüber HPP oder HPS und zwar unabhängig davon, wie es aktiviert worden ist. Die Notwendigkeit einer Aktivierung zwecks Faktorfreisetzung entfällt im Falle von HPP oder HPS.

Interessant scheint hierbei besonders HPP, welches wie auch PRP Fibrinogen beinhaltet. Das Fibrinogen wird durch (physiologischen oder externen) Kontakt mit Thrombin zu Fibrin gespalten. Durch Quervernetzung mit Faktor XIII entsteht eine dreidimensionale Fibrinmatrix, die einen Teil der Angiogenesefaktoren zurückhält und außerdem ein temporäres Gerüst für endogene Zellen darstellt (Anitua et al., 2012). In den vorliegenden Versuchen stellte sich HPS jedoch mit HPP und PRP verglichen als gleichwertig dar.

Das Besondere an diesen Kulturmedien ist, dass ihre Zusammensetzung hinsichtlich Konzentration und Verhältnis von der Größe der vorliegenden patienteneigenen Zellpopulationen abhängig ist (Di Santo et al., 2009; Hadjipanayi & Schilling, 2014). Diese Feststellung könnte auch erklären, dass trotz identischer Aufbereitung der Spenderblutproben unterschiedliche Ergebnisse in den Assays erzielt wurden.

Hadjipanayi et al. konnten 2013 beobachten, dass es durch die hypoxisch präkonditionierten PBZs gesunder Probanden zu einer signifikant unterschiedlichen VEGF Expression kommt (Hadjipanayi et al., 2013). Zu erklären wäre dies möglicherweise durch individuelle Differenzen im HIF System selbst (Brooks et al., 2009). Diese Heterogenität weist auf eventuelle Unterschiede in den Anforderungen an die adaptive Angiogenese und damit auf eine suffiziente Wundheilung hin (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Auch dies wäre ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse der Blutderivate verschiedener Blutspender der vorliegenden Arbeit.

In der Literatur ist seit längerer Zeit bekannt, dass die Aktivität des Zellmetabolismus direkt mit der Proteinsynthese selbiger Zellen korreliert (Burdon, 1987). Vor diesem Hintergrund liegt die Annahme nah, dass die Expression angiogener Wachstumsfaktoren ebenso stark temperaturabhängig ist. Daher haben Hadjipanayi et al. anhand des VEGF-Spiegels isolierte PBZ Blutkulturen bei 20°C (Raumtemperatur) und bei 37°C (Körpertemperatur) beobachtet (Hadjipanayi et al., 2013). Es zeigten sich bei 37°C VEGF Konzentrationen, die 3-mal höher ausfielen, als

VII. Diskussion

in der Vergleichsgruppe unter Raumtemperatur (Hadjipanayi et al., 2013). Diese Feststellung zeigt die Bedeutung der physiologischen Umgebungstemperatur, unter welcher auch in der vorliegenden Arbeit PBZs extrakorporal zu konditionieren waren. Es gilt jedoch zu beachten, dass der VEGF Spiegel schon bei der Blutabnahme steigt, da hierbei die Intima des Blutgefäßes durch die Punktion iatrogen verletzt wird. Es resultiert eine Aggregation der Thrombozyten, welche vasoaktive Substanzen wie VEGF freisetzen (Maloney et al., 1998). In meinem Versuchsaufbau ist dies jedoch ein unumgänglicher Störfaktor. Da jedoch die Blutentnahme aller Testmedien unter denselben Bedingungen vonstatten ging, gehe ich davon aus, dass die Level der Wachstumsfaktoren immer dieselben waren.

Doch nicht nur Thrombozyten und Granulozyten, sondern auch die peripheren mononukleären Zellen sind Produzenten von angiogenen Proteinen (de Paulis et al., 2006; Hadjipanayi et al., 2013; Kusumanto, Dam, Hospers, Meijer, & Mulder, 2003; Maloney et al., 1998; McCourt, Wang, Sookhai, & Redmond, 1999; Puxeddu et al., 2005). Da die entsprechenden Vollblutprodukte bei ihrer Testung im Aortic Ring Assay und im Tube Formation Assay unterschiedlich vorbehandelt waren, differieren mutmaßlich auch die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren im Endprodukt.

Die Versuchsergebnisse unter Abschnitt V.A legen nahe, dass für die Freisetzung von parakrinen Proteinen in Plasma und HPP das Vorliegen von Calcium zwingend notwendig ist. Dies erklärt, weshalb es unter EDTA-Antikoagulation weder zu einem Vessel Sprouting im ARA, noch zu einer Formation von Nodes und Tubes im TFA kam.

Die hypoxische Konditionierung der Zellen kann entweder durch einen Sauerstoffkontrollierenden Inkubator erfolgen oder durch eine hypoxische Mikroumgebung, in welcher der niedrige Sauerstoffgehalt durch den eigenen Sauerstoffverbrauch der Zellen entsteht (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Letztere bringt den Vorteil mit sich, dass die Zellen keiner künstlichen Umgebung ausgesetzt sind, sondern sich die Zellen in ihrer selbst regulierten Hypoxie sehr natürlich in enger Anlehnung an *in vivo* Konditionen verhalten (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Dies hätte zudem den positiven Effekt einer erleichterten und günstigeren klinischen Anwendung, da ein spezieller Sauerstoff-kontrollierender Inkubator nicht mehr nötig wäre.

Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass sich die Faktor-Expression der PBZs in Laufe der Zeit ändert (Hadjipanayi et al., 2013), schien die Dauer der

VII. Diskussion

Konditionierung eine geeignete Stellschraube in Bezug auf Faktor-Konzentration und -Verhältnis. Unsere Arbeitsgruppe zeigte zuvor, dass die VEGF Freisetzung in Hypoxie-konditionierten PBZs hochreguliert war, die Expression des antiangiogenen Faktors TSP-1 jedoch erst hoch- und dann unter längerer Hypoxie herunterreguliert schien (Hadjipanayi et al., 2013). Auch andere Autoren diskutierten bereits den möglicherweise inhibierenden Effekt der Hypoxie auf die antiangiogene Signalkaskade, die eine Anpassung sein könnte, um auch unter Hypoxie langfristig die Angiogenese ermöglichen zu können (Hadjipanayi et al., 2013; C. J. Hu et al., 2006; Laderoute et al., 2000; Tenan et al., 2000). Dieses zeigt vor allem, wie anhängig die Angiogenese von einer dynamischen, fein abgestimmten Balance pro- und antiangiogener Faktoren ist. Von diesen Erkenntnissen ausgehend, vermuteten wir, dass eine Hypoxie-Inkubation von 4 Tagen versus 7 Tagen eine veränderte Angiogenese Response im Tube Formation Assay generieren würde. Diese Annahme konnte in den vorliegenden Versuchen jedoch nicht bestätigt werden (s. Abb. 13 und 14).

Auch wenn hypoxischer Stress die Zellen dazu anregt, Wachstumsfaktoren auszuschütten, so geht dieser Effekt auch mit einem vermehrten Zelltod einher (Cheema et al., 2008; Hadjipanayi et al., 2013). Denn obwohl die verwendeten hypoxisch präkonditionierten Blutprodukte (hypB) autologen Ursprungs sind, birgt das Einbringen apoptotischer Zellen die Gefahr einer immunologischen oder inflammatorischen Reaktion (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Im Fall von PRP wäre das Produkt jedoch sofort gebrauchsfertig, ohne einen großen Teil an Zelldetritus zu beinhalten. Aus diesem Grund müssten bei dem Gebrauch von HPP und HPS vor der Anwendung am lebendigen Organismus entsprechende Sekretome vorher gefiltert werden, um zelluläre Komponenten zu eliminieren (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Ein entsprechendes Filtersystem wurde für das Beispiel HPP bereits von Hadjipanayi et al. entwickelt (Hadjipanayi et al., 2013).

Lange Zeit wurde die Plättchen Aktivierung in PRP und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus ihren Granula als vielversprechende Strategie gesehen, um die Angiogenese zu induzieren (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Trotzdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass neben den proangiogenen Faktoren ebenso eine große Menge an angiostatischen Faktoren, wie z.B. PF-4 (Platelet Factor-4) oder TSP-

VII. Diskussion

1 (Thrombospondin-1) aus den Plättchen freigesetzt wird (Hadjipanayi & Schilling, 2014). In Plättchenkonzentraten wie PRP kommen solche Faktoren in unphysiologisch hohen Konzentrationen vor und sind daher in der Lage, die angiogene Response negativ zu beeinflussen (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Dies könnte der Grund dafür sein, dass der Erfolg von PRP-Therapien bei chronischen Wunden in klinischen Studien bislang ausblieb (Carter, Fyelling, & Parnell, 2011; Martinez-Zapata et al., 2016) und auch im durchgeführten ARA und TFA zu keiner starken Ausbildung von Gefäßstrukturen führte. Verglichen mit Plättchenprodukten bietet die hypoxische Präkonditionierung von Serum oder Plasma eine natürliche Steigerung der Wachstumsfaktorausschüttung aus peripheren Blutzellen, ohne sich nur auf die Faktoren aus der Plättchengranula zu beschränken (Hadjipanayi & Schilling, 2014). Dies trifft besonders auf HPP zu, in welchem durch Antikoagulation keine Plättchenaktivierung stattfindet. In vorherigen Studien fanden sich in HPP PF-4 Konzentrationen, die bis zu 30% geringer waren, als in Serum (Hadjipanayi et al., 2013).

Zudem muss die Frage aufgeworfen werden, in wie fern Thrombozyten überhaupt stimulierend auf die Angiogenese in Wunden wirken. Während der Wundheilung sind Blutplättchen vor allem in der Initialphase der Entzündung aktiv und vermitteln die primäre Hämostase wenige Minuten nach der Gewebeverletzung (Midwood, Williams, & Schwarzbauer, 2004; Reinke & Sorg, 2012). Erst nach 3-4 Tagen kommt es in der Granulationsphase der Wundheilung zum Einsetzen der Angiogenese, bei der verschiedene Stimuli auf die Thrombozyten einwirken und pro- oder antiangiogene Faktoren freigesetzt werden (Chatterjee et al., 2011; Reinke & Sorg, 2012; P. H. Wang, Huang, Horng, Yeh, & Chen, 2018). Möglicherweise wirken Thrombozyten daher eher regulatorisch, anstatt die Angiogenese zu induzieren (Hadjipanayi & Schilling, 2014).

Der Einsatz von hypB in (chronischen) Wunden bietet somit die Möglichkeit, PBCs einer natürlichen, hypoxischen Wundsimulation auszusetzen. Dem minderperfundierten Gewebe wird somit eine feinjustierte Zusammensetzung an pro- und antiangiogenen Proteinen zur Verfügung gestellt, obwohl das komplexe Zusammenspiel an Wachstumsfaktoren noch nicht vollständig entschlüsselt ist (Hadjipanayi & Schilling, 2013).

D. Steigerung der Angiogenese durch Verdünnung hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte

In meinen Versuchen wurde deutlich, dass unverdünnte Blutderivate sowohl im Aortic Ring Assay, als auch in Tube Formation Assay eine schwächere Angiogeneseresponse generierten, als bei der Verwendung in bestimmten Verdünnungen.

Diese Feststellung scheint zunächst paradox, geht man davon aus, dass sich eine hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren proportional zum Gefäßwachstum verhält. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Zellen in beiden Assays unphysiologisch hohen Mengen an Wachstumsfaktoren ausgesetzt sind. Denn während entsprechende parakrine Proteine im Körper zwar lokal wirken und sich in das umliegende Gewebe verteilen und abgebaut werden, sammeln sich die Wachstumsfaktoren in den Assays auf kleinstem Raum.

Im ARA wurde jeweils am 3. und am 5. Tag nach Ansetzen des Assays ein Medienwechsel vollzogen, um zu gewährleisten, dass der Gehalt an angiogenen Faktoren im Medium konstant bleibt.

Zur Schonung des Matrigels™ wurden jeweils 120 µl des alten Mediums entnommen und 150 µl des neuen Mediums hinzugefügt. Wenn nun von einem Absinken der Wachstumsfaktoren mit Diffusion in die Gelmatrix ausgegangen wird, hätte dies zur Folge, dass der Gehalt an Wachstumsfaktoren keinesfalls gleich bliebe, sondern sich konsekutiv mit jedem Medienwechsel erhöht. Da ein Medienwechsel lediglich im ARA, nicht jedoch im TFA erfolgte, bewerte ich auch dies als Grund für unterschiedliche Wachstumsergebnisse zwischen den Assays.

Somit kann auch der pro-angiogene Faktor VEGF, in großen Mengen verwendet, das Gefäßwachstum negativ beeinflussen, indem funktionslose, poröse Gefäße entstehen (De Rossi et al., 2013; Rouwkema, Rivron, & van Blitterswijk, 2008). Dies passt zu der Feststellung, dass VEGF als Positivkontrolle in meinen Versuchen ein deutlich geringeres Wachstum im ARA und TFA generiert, als es in Vollblutderivaten wie Serum und Plasma der Fall ist. Nichtsdestotrotz wird allein durch den Versuchsaufbau des ARA ein Verdünnungseffekt der Blutprodukte erzielt. Denn während die HUVECs im Tube Formation Assay unmittelbar von den Blutderivaten umgeben sind, findet im ARA eine Diffusion der Wachstumsfaktoren durch das Matrigel hindurch in Richtung des Aortenringes statt. Diese zusätzliche Verdünnung der Faktorkonzentration ist

VII. Diskussion

daher auch ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass das Angiogenesemaximum verschiedener (vorverdünnter) Blutprodukte in den Assays bei unterschiedlicher Verdünnungsstärke erzielt wurde.

Wie eingangs erwähnt, wird das Milieu von Wachstumsfaktoren in einer Wundsituation durch eine feine Balance pro- und anti-angiogener Proteine bestimmt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass für eine suffiziente Gefäßneubildung neben den stimulierenden Faktoren auch eine Inhibition notwendig ist.

So ist seit einiger Zeit bekannt, dass der angiostatische Faktor PF-4 mit VEGF interagiert und über Modulation der Zellmigration VEGF in seiner angiogenen Wirkung unterstützt (Hang et al., 2013). Wenn nun in unseren Versuchen das jeweilige Sekretum verdünnt wurde, so blieb das Verhältnis der Wachstumsfaktoren gleich. Es wurde beobachtet, dass die Ausbildung von Sprouts im ARA, sowie Nodes und Tubes im TFA jedoch ihr Maximum dann fand, wenn ein Blutderivat verdünnt wurde. Bei weiterer Verdünnung nahm jedoch die Angiogeneseresponse ab. Wir gehen daher davon aus, dass sich die Wirkung der angiogenen und angiostatischen Proteine nicht linear verhält. Eine Hemmwirkung wird vor allem bei entweder sehr hohen oder sehr niedrigen Konzentrationen erzielt. So könnte auch der bisher ausgebliebene klinische Erfolg in der Behandlung chronischer Wunden durch PRP zu erklären sein (Hadjipanayi & Schilling, 2014; Scalfani & McCormick, 2012; Stammers et al., 2009; Weller, Gardiner, Arthur, Southey, & Andrews, 2019; Zhang et al., 2019), da hier mit einer großen Menge an Thrombozyten eine ebenso große Konzentration an Wachstumsfaktoren ausgeschüttet wird.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die ungleichen Wachstumsmaxima beider Assays ist, dass die Zellen im ARA und im TFA unterschiedliche Wachstumsfaktoren benötigen. Da der ARA nicht nur Endothelzellen beinhaltet (siehe Kapitel VI.A.1 „*Aortic Ring Assay*“), braucht er Wachstumsfaktoren für die Initiation des Abbaus der extrazellulären Matrix, der Zellmigration, der Zellproliferation und der strukturellen Reorganisation.

Der Tube Formation Assay, welcher aus Endothelzellen besteht, erfordert lediglich das Vorhandensein der Wachstumsfaktoren für die Zellmigration, wie z.B. PDGF.

E. Limitationen

Die Interpretationsmöglichkeiten dieser Arbeit werden dadurch eingeschränkt, dass die Testreihen mit nur vier Blutspendern durchgeführt wurden. Daher dienen die Ergebnisse prinzipiell einer ersten Orientierung im Sinne einer Grundlagenforschung zur Hypothesengenerierung, die es jetzt ermöglicht, diese Daten mit größeren Patientenreihen zu verifizieren. Denkbar wäre dann die Blutaufbereitung nicht nur, wie hier gezeigt, von jungen, gesunden Spendern sondern insbesondere von Patienten mit eingeschränkter adaptiver Angiogenese. Zu nennen sind hier besonders Diabetiker und Patienten mit peripherer arteriellen Verschlusskrankheit. Da sich diese Patientengruppen im klinischen Alltag oftmals multimorbide darstellen und polypharmakologisch behandelt werden, wirft sich zudem die Frage auf, ob und wie beispielsweise Antihypertensiva, Statine oder Antidiabetika das Gleichgewicht der Angiogenesefaktoren im Blut beeinflussen. Nicht zu vergessen handelt es sich in einem solchen Patientenkollektiv mit chronischen Wundheilungsstörungen zumeist um ältere Patienten mit verlangsamtem Metabolismus, die nicht selten zusätzlich mit einer bakteriellen Superinfektion zu kämpfen haben. Praxisrelevant ist daher also auch die Frage, wie sich bestimmte Bakterienstämme oder ihre antibiotischen Therapien auf die pro- und anti-angiogene Balance im Blut auswirken, da es zu starken intraindividuellen Schwankungen in der Faktorzusammensetzung zu kommen scheint. Um welche Angiogenesefaktoren es sich genau handelt und welche der vielen bekannten Faktoren eine Rolle spielen, müsste zudem in einer quantitativen Proteinanalyse (z.B. ELISA) eruiert werden. Ebenso ist auch der genaue molekulare Mechanismus der hier aufgeführten Verdünnungseffekte ungeklärt.

Eine weitere Limitation der Versuchsergebnisse besteht darin, dass der Ursprung der im ARA verwendeten Aorten nicht human, sondern murin ist. Lediglich die getesteten Blutprodukte stammen von menschlichen Spendern. Somit wird die Aussagekraft der angiogenen Reaktion im ARA auf die verschieden aufbereiteten Blutprodukte eingeschränkt.

F. Ausblick

Die Erkenntnisse dieser Arbeit spiegeln nur die angiogene Wirkung hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte *in vitro* wider.

Sollten sich die Ergebnisse in klinischen Studien mit Patienten, welche an stenosierenden Gefäßerkrankungen leiden, reproduzieren lassen, wäre der nächste Schritt die Entwicklung einer geeigneten Wundauflage. Diese Erkenntnisse eröffnen somit die Möglichkeit auf eine neuartige, auf den Patienten angepasste, personalisierte Therapie, die die Dauer von Hospitalisierungen womöglich drastisch reduziert.

VIII. Zusammenfassung

Angiogenese ist eines der Hauptmerkmale für eine Vielzahl an Pathologien wie Krebserkrankungen oder chronischen Entzündungsvorgängen. Eine Angiogeneseinduktion eröffnet die Möglichkeit, insbesondere ischämische Krankheitsbilder mit unzureichender Wundheilung der Haut zu behandeln.

Dies ist wissenschaftlich und sozio-ökonomisch von großem Interesse, da okklusive Gefäßerkrankungen heutzutage die Haupttodesursache in den Industriestaaten darstellen und ihre Verbreitung demografisch bedingt langfristig zunimmt (Chicharro-Alcántara et al., 2018; Selvin & Erlinger, 2004).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe des dreidimensionalen Aortic Ring Assays und des zweidimensionalen Tube Formation Assays das angiogene Potenzial hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte zu evaluieren.

Bedeutende Vorteile der getesteten autologen hypoxisch präkonditionierten Blutprodukte sind ihr einfacher und kostengünstiger Herstellungsprozess, sowie ihre gute Verträglichkeit aufgrund der autologen Herkunft des individuell für den Patienten produzierten Produktes.

In unseren Versuchen wurde deutlich, dass eine Zeitverlängerung der Inkubation keinen wesentlichen Einfluss auf die angiogene Wirkung von hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten hat. Jedoch konnte gezeigt werden, dass durch Verdünnung diverser Blutderivate ein verstärktes Gefäßwachstum *in vitro* erzielt werden kann.

Dies erklärt sich vermutlich durch die absolute Hemmwirkung von Wachstumsfaktoren, welche entweder in sehr hohen oder sehr niedrigen Konzentrationen auf gefäßeigene Zellen einwirken.

Gelänge eine Translation der hier erreichten *in vitro* Vorgänge auf die klinische Anwendung, so kann durch eine bestimmte Balance von pro- und anti-angiogenen Proteinen die lokale Angiogenese in minder perfundierten Wunden gesteigert werden.

Die spätere klinische Anwendung von hypoxisch präkonditionierten Blutprodukten in der Wundheilung könnte zwar die Regenerationsdauer verringern, jedoch vermag sie vorerst essentielle konventionelle Behandlungsmethoden nicht zu ersetzen. So wird

VIII. Zusammenfassung

auch in Zukunft beispielsweise das Débridement von nekrotischem Gewebe bis auf weiteres unumgänglich sein.

Durch die vorliegende Arbeit wurden Grundlagen der Angiogenese eruiert, welche es ermöglichen könnten, bestehende Therapieansätze zu verbessern. Hierzu bedarf es im nächsten Schritt jedoch klinischer Studien.

IX. Literaturverzeichnis

1. Ackermann, M., Tsuda, A., Secomb, T. W., Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2013). Intussusceptive Remodeling of Vascular Branch Angles in Chemically-Induced Murine Colitis. *Microvasc Res*, 87, 75-82. doi:10.1016/j.mvr.2013.02.002
2. Aghaloo, T. L., Moy, P. K., & Freymiller, E. G. (2004). Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19(1), 59-65.
3. Ahmad, Z., Howard, D., Brooks, R. A., Wardale, J., Henson, F. M., Getgood, A., & Rushton, N. (2012). The role of platelet rich plasma in musculoskeletal science. *JRSM Short Rep*, 3(6), 40. doi:10.1258/shorts.2011.011148
4. Al-Khaldi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J., & Lachapelle, K. (2003). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*, 75(1), 204-209.
5. Alby, L., & Auerbach, R. (1984). Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18), 5739-5743.
6. AlMalki, W. H., Shahid, I., Mehdi, A. Y., & Hafeez, M. H. (2014). Assessment methods for angiogenesis and current approaches for its quantification. *Indian J Pharmacol*, 46(3), 251-256. doi:10.4103/0253-7613.132152
7. Alsousou, J., Thompson, M., Hulley, P., Noble, A., & Willett, K. (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*, 91(8), 987-996. doi:10.1302/0301-620x.91b8.22546
8. Amable, P. R., Carias, R. B., Teixeira, M. V., da Cruz Pacheco, I., Correa do Amaral, R. J., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*, 4(3), 67. doi:10.1186/scrt218
9. Amann, B., Luedemann, C., Ratei, R., & Schmidt-Lucke, J. A. (2009). Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant*, 18(3), 371-380.
10. An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., & Neckers, L. M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, 392(6674), 405-408. doi:10.1038/32925
11. Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14(4), 529-535.

IX. Literaturverzeichnis

12. Anitua, E., Alkhraisat, M. H., & Orive, G. (2012). Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J Control Release*, 157(1), 29-38. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.004
13. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., & Nurden, A. T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91(1), 4-15. doi:10.1160/th03-07-0440
14. Anitua, E., Andia, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zaldueño, M., de la Fuente, M., Nurden, A. T. (2005). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*, 23(2), 281-286. doi:10.1016/j.orthres.2004.08.015
15. Anitua, E., Sanchez, M., Orive, G., & Andia, I. (2008). Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 29(1), 37-41. doi:10.1016/j.tips.2007.10.010
16. Aplin, A. C., Fogel, E., Zorzi, P., & Nicosia, R. F. (2008). The aortic ring model of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 443, 119-136. doi:10.1016/s0076-6879(08)02007-7
17. Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279(37), 38458-38465. doi:10.1074/jbc.M406026200
18. Appell, H. J. (1980). Morphological Studies on Skeletal Muscle Capillaries Under Conditions of High Altitude Training. *Int J Sports Med*, 01(03), 103-109. doi:10.1055/s-2008-1034643
19. Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 12(3), 267-274. doi:10.1007/s10456-009-9146-4
20. Arnaoutova, I., & Kleinman, H. K. (2010). In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc*, 5(4), 628-635. doi:10.1038/nprot.2010.6
21. Ashton, N. (1961). Neovascularization in ocular disease. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 81, 145-161.
22. Auerbach, R. (1991). Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int J Radiat Biol*, 60(1-2), 1-10.
23. Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R. L., & Shinnars, B. L. (2000). Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev*, 19(1-2), 167-172.

IX. Literaturverzeichnis

24. Auerbach, R., & Joseph, J. (1984). Cell surface markers on endothelial cells: a developmental perspective. In E. A. Jaffe (Ed.), *Biology of Endothelial Cells* (pp. 393-400). Boston, MA: Springer US.
25. Auerbach, W., & Auerbach, R. (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther*, 63(3), 265-311.
26. Baker, M., Robinson, S. D., Lechertier, T., Barber, P. R., Tavora, B., D'Amico, G., Hodivala-Dilke, K. (2011). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc*, 7(1), 89-104. doi:10.1038/nprot.2011.435
27. Bellacen, K., & Lewis, E. C. (2009). Aortic Ring Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(33), 1564. doi:10.3791/1564
28. Ben-Shoshan, J., Schwartz, S., Luboshits, G., Maysel-Auslender, S., Barzelay, A., Polak-Charcon, S., George, J. (2008). Constitutive expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem Cells*, 26(10), 2634-2643. doi:10.1634/stemcells.2008-0369
29. Benjamin, L. E., Hemo, I., & Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125(9), 1591-1598.
30. Berra, E., Ginouves, A., & Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*, 7(1), 41-45. doi:10.1038/sj.embor.7400598
31. Bier, A. (1905). Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. *Med. Klinik*, 1,2.
32. Bouchentouf, M., Paradis, P., Forner, K. A., Cuerquis, J., Boivin, M. N., Zheng, J., Galipeau, J. (2010). Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction. *Cell Transplant*, 19(4), 369-386. doi:10.3727/096368909x484266
33. Boulton, A. J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*, 366(9498), 1719-1724. doi:10.1016/s0140-6736(05)67698-2
34. Braun, R. D., Lanzen, J. L., Snyder, S. A., & Dewhirst, M. W. (2001). Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(6), H2533-2544. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2533
35. Brooks, J. T., Elvidge, G. P., Glenny, L., Gleadle, J. M., Liu, C., Ragoussis, J., Robbins, P. A. (2009). Variations within oxygen-regulated gene expression in humans. *J Appl Physiol* (1985), 106(1), 212-220. doi:10.1152/jappphysiol.90578.2008

IX. Literaturverzeichnis

36. Bunn, H. F., & Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 76(3), 839-885. doi:10.1152/physrev.1996.76.3.839
37. Burdon, R. H. (1987). Temperature and animal cell protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 41, 113-133.
38. Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K. P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., & Lewis, C. E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*, 163(4), 1233-1243. doi:10.1016/s0002-9440(10)63483-9
39. Bussolino, F., Caccavari, F., Valdembri, D., & Serini, G. (2009). Angiogenesis: a balancing act between integrin activation and inhibition? *Eur Cytokine Netw*, 20(4), 191-196. doi:10.1684/ecn.2009.0168
40. Caduff, J. H., Fischer, L. C., & Burri, P. H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec*, 216(2), 154-164. doi:10.1002/ar.1092160207
41. Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M., & Kenney, E. B. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*, 37(4), 300-306.
42. Canalis, E., McCarthy, T., & Centrella, M. (1988). Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*, 81(2), 277-281. doi:10.1172/jci113318
43. Cao, Y. (2009). Monotherapy versus combination therapy of angiogenic and arteriogenic factors for the treatment of ischemic disorders. *Curr Mol Med*, 9(8), 967-972.
44. Cao, Y. (2014). Angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Chem Immunol Allergy*, 99, 170-179. doi:10.1159/000353254
45. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6, 389. doi:10.1038/74651
46. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6), 653-660. doi:10.1038/nm0603-653
47. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936. doi:10.1038/nature04478
48. Carmeliet, P., & Collen, D. (1998). Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int*, 53(6), 1519-1549. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00936.x

IX. Literaturverzeichnis

49. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692), 485-490. doi:10.1038/28867
50. Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi:10.1038/nature10144
51. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1239-1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x
52. Carter, M. J., Fylling, C. P., & Parnell, L. K. (2011). Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty*, 11, e38.
53. Cervelli, V., Gentile, P., Scioli, M. G., Grimaldi, M., Casciani, C. U., Spagnoli, L. G., & Orlandi, A. (2009). Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*, 15(4), 625-634. doi:10.1089/ten.TEC.2008.0518
54. Chahla, J., Cinque, M. E., Piuze, N. S., Mannava, S., Geeslin, A. G., Murray, I. R., LaPrade, R. F. (2017). A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting: A Systematic Review of the Clinical Orthopaedic Literature. *J Bone Joint Surg Am*, 99(20), 1769-1779. doi:10.2106/jbjs.16.01374
55. Chamberlain, M. C. (2011). Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol*, 5, 117-129. doi:10.4137/cmo.S7232
56. Chatterjee, M., Huang, Z., Zhang, W., Jiang, L., Hultenby, K., Zhu, L., Li, N. (2011). Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood*, 117(14), 3907-3911. doi:10.1182/blood-2010-12-327007
57. Cheema, U., Brown, R. A., Alp, B., & MacRobert, A. J. (2008). Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cell Mol Life Sci*, 65(1), 177-186. doi:10.1007/s00018-007-7356-8
58. Chicharro-Alcántara, D., Rubio-Zaragoza, M., Damiá-Giménez, E., Carrillo-Poveda, J. M., Cuervo-Serrato, B., Peláez-Gorrea, P., & Sopena-Juncosa, J. J. (2018). Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 10. doi:10.3390/jfb9010010
59. Cmolik, B. L., Spero, J. A., Magovern, G. J., & Clark, R. E. (1993). Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced

IX. Literaturverzeichnis

- factor V deficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 105(2), 222-227; discussion 227-228.
60. Cockerill, G. W., Gamble, J. R., & Vadas, M. A. (1995). Angiogenesis: models and modulators. *Int Rev Cytol*, 159, 113-160.
 61. Conway, K., Price, P., Harding, K. G., & Jiang, W. G. (2006). The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound Repair Regen*, 14(1), 2-10.
doi:10.1111/j.1743-6109.2005.00081.x
 62. Coultas, L., Chawengsaksophak, K., & Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438(7070), 937-945.
doi:10.1038/nature04479
 63. de Paulis, A., Prevede, N., Fiorentino, I., Rossi, F. W., Staibano, S., Montuori, N., Marone, G. (2006). Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol*, 177(10), 7322-7331.
 64. De Rossi, G., Scotland, R., & Whiteford, J. (2013). Critical Factors in Measuring Angiogenesis Using the Aortic Ring Model. *J Genet Syndr Gene Ther*, 4(5). doi:10.4172/2157-7412.1000147
 65. DeCicco-Skinner, K. L., Henry, G. H., Cataisson, C., Tabib, T., Gwilliam, J. C., Watson, N. J., Wiest, J. S. (2014). Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(91), e51312-e51312. doi:10.3791/51312
 66. Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest*, 98(9), 1949-1953.
doi:10.1172/jci118997
 67. Denekamp, J. (1999). The tumour microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective. *Eur J Clin Invest*, 29(9), 733-736.
 68. Di Santo, S., Yang, Z., Wyler von Ballmoos, M., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I., & Kalka, C. (2009). Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*, 4(5), e5643.
doi:10.1371/journal.pone.0005643
 69. Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S. A., & Burri, P. H. (2000). Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res*, 86(3), 286-292.
 70. Djonov, V. G., Galli, A. B., & Burri, P. H. (2000). Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. *Anat Embryol (Berl)*, 202(5), 347-357.

IX. Literaturverzeichnis

71. Djonov, V. G., Kurz, H., & Burri, P. H. (2002). Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn*, 224(4), 391-402. doi:10.1002/dvdy.10119
72. Dugrillon, A., Eichler, H., Kern, S., & Kluter, H. (2002). Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31(6), 615-619. doi:10.1054/ijom.2002.0322
73. Efeoglu, C., Akcay, Y. D., & Erturk, S. (2004). A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(11), 1403-1407.
74. Elfstrom, C. E. a. G., A.V. (1898). A preliminary report of experiments with heated blood in the treatment of croupous pneumonia and tuberculosis pulmonalis. *New York med. Journal*, LXVIII(No. 9), 307-309.
75. Elson, D. A., Thurston, G., Huang, L. E., Ginzinger, D. G., McDonald, D. M., Johnson, R. S., & Arbeit, J. M. (2001). Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev*, 15(19), 2520-2532. doi:10.1101/gad.914801
76. Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Recent advances and emerging treatments. *Bmj*, 332(7547), 962-965. doi:10.1136/bmj.332.7547.962
77. Eppley, B. L., Woodell, J. E., & Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 114(6), 1502-1508.
78. Fennis, J. P., Stoelinga, P. J., & Jansen, J. A. (2004). Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1), 48-55. doi:10.1054/ijom.2003.0452
79. Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6), 669-676. doi:10.1038/nm0603-669
80. Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438, 967. doi:10.1038/nature04483
81. Ferrenq, I., Tranqui, L., Vailhe, B., Gumery, P. Y., & Tracqui, P. (1997). Modelling biological gel contraction by cells: mechanocellular formulation and cell traction force quantification. *Acta Biotheor*, 45(3-4), 267-293.
82. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186. doi:10.1056/nejm197111182852108

IX. Literaturverzeichnis

83. Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6(4), 273-286. doi:10.1038/nrd2115
84. Fong, G. H., & Takeda, K. (2008). Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*, 15(4), 635-641. doi:10.1038/cdd.2008.10
85. Forster, E. (1942). Umstimmungs- und Reiztherapie mit kurzwellenbestrahltem Blut. *Dtsch med Wochenschr*, 68(04), 86-89. doi:10.1055/s-0028-1120026
86. Fox, S. B. (2001). Microscopic assessment of angiogenesis in tumors. *Methods Mol Med*, 46, 29-46. doi:10.1385/1-59259-143-4:029
87. Fraisl, P., Aragonés, J., & Carmeliet, P. (2009). Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nat Rev Drug Discov*, 8(2), 139-152. doi:10.1038/nrd2761
88. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., & Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell*, 16(2), 167-179. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.003
89. Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161(6), 1163-1177. doi:10.1083/jcb.200302047
90. Giordano, G. F., Rivers, S. L., Chung, G. K., Mammana, R. B., Marco, J. D., Raczkowski, A. R., Strug, B. S. (1988). Autologous platelet-rich plasma in cardiac surgery: effect on intraoperative and postoperative transfusion requirements. *Ann Thorac Surg*, 46(4), 416-419.
91. Girdler, N. M., McGurk, M., Aqual, S., & Prince, M. (1995). The effect of epidermal growth factor mouthwash on cytotoxic-induced oral ulceration. A phase I clinical trial. *Am J Clin Oncol*, 18(5), 403-406.
92. Goodwin, A. M. (2007). In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res*, 74(2-3), 172-183. doi:10.1016/j.mvr.2007.05.006
93. Greenhalgh, D. G., Hummel, R. P., Albertson, S., & Breeden, M. P. (1993). Synergistic actions of platelet-derived growth factor and the insulin-like growth factors in vivo. *Wound Repair Regen*, 1(2), 69-81. doi:10.1046/j.1524-475X.1993.10206.x
94. Griga, T., Gutzeit, A., Sommerkamp, C., & May, B. (1999). Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11(2), 175-179.
95. Gumkowski, F., Kaminska, G., Kaminski, M., Morrissey, L. W., & Auerbach, R. (1987). Heterogeneity of mouse vascular endothelium. In vitro studies of

IX. Literaturverzeichnis

- lymphatic, large blood vessel and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels*, 24(1-2), 11-23.
96. Haase, I., Evans, R., Pofahl, R., & Watt, F. M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci*, 116(Pt 15), 3227-3238. doi:10.1242/jcs.00610
97. Hadjipanayi, E., Bauer, A. T., Moog, P., Salgin, B., Kuekrek, H., Fersch, B., Schilling, A. F. (2013). Cell-free carrier system for localized delivery of peripheral blood cell-derived engineered factor signaling: towards development of a one-step device for autologous angiogenic therapy. *J Control Release*, 169(1-2), 91-102. doi:10.1016/j.jconrel.2013.04.008
98. Hadjipanayi, E., Cheema, U., Hopfner, U., Bauer, A., Machens, H. G., & Schilling, A. F. (2012). Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling. *J Control Release*, 161(3), 852-860. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.048
99. Hadjipanayi, E., Moog, P., Bekeran, S., Kirchhoff, K., Berezhnoi, A., Aguirre, J., Dornseifer, U. (2019). In Vitro Characterization of Hypoxia Preconditioned Serum (HPS)-Fibrin Hydrogels: Basis for an Injectable Biomimetic Tissue Regeneration Therapy. *J Funct Biomater*, 10(2). doi:10.3390/jfb10020022
100. Hadjipanayi, E., & Schilling, A. F. (2013). Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. *Organogenesis*, 9(4), 261-272. doi:10.4161/org.25970
101. Hadjipanayi, E., & Schilling, A. F. (2014). Regeneration through autologous hypoxia preconditioned plasma. *Organogenesis*, 10(2), 164-169. doi:10.4161/org.29208
102. Hang, T. C., Tedford, N. C., Reddy, R. J., Rimchala, T., Wells, A., White, F. M., Lauffenburger, D. A. (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet (PF-4) factor 4 inputs modulate human microvascular endothelial signaling in a three-dimensional matrix migration context. *Mol Cell Proteomics*, 12(12), 3704-3718. doi:10.1074/mcp.M113.030528
103. Havlicek, H. (1934). Die Behandlung eitriger Prozesse mit Reinjektion ultraviolett bestrahlen Blutes und Eiters. *Arch. Klin. Chir.*, 180.
104. Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79(4), 1283-1316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283
105. Highmore, W. (1874). Practical remarks on an overlooked source of blood-supply for transfusion in post-partum haemorrhage, suggested by a recent fatal case. *The Lancet*, 103(2629), 89-90.

IX. Literaturverzeichnis

106. Ho, T. K., Abraham, D. J., Black, C. M., & Baker, D. M. (2006). Hypoxia-inducible factor 1 in lower limb ischemia. *Vascular*, 14(6), 321-327. doi:10.2310/6670.2006.00056
107. Hodivala-Dilke, K. M., Reynolds, A. R., & Reynolds, L. E. (2003). Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res*, 314(1), 131-144. doi:10.1007/s00441-003-0774-5
108. Hollenbeck, S. T., Senghaas, A., Komatsu, I., Zhang, Y., Erdmann, D., & Klitzman, B. (2012). Tissue engraftment of hypoxic-preconditioned adipose-derived stem cells improves flap viability. *Wound Repair Regen*, 20(6), 872-878. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00854.x
109. Holzinger, C., Zuckermann, A., Kopp, C., Schollhammer, A., Imhof, M., Zwolfer, W., Wolner, E. (1994). Treatment of non-healing skin ulcers with autologous activated mononuclear cells. *Eur J Vasc Surg*, 8(3), 351-356.
110. Hom, D. B. (2008). New developments in wound healing relevant to facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*, 10(6), 402-406. doi:10.1001/archfaci.10.6.402
111. Hsu, C., & Chang, J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am*, 29(4), 551-563. doi:10.1016/j.jhsa.2004.04.020
112. Hu, C. J., Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. N., Chen, C. M., Huang, T. H., & Hsu, C. Y. (2006). Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(12), 1519-1526. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600304
113. Hu, X., Yu, S. P., Fraser, J. L., Lu, Z., Ogle, M. E., Wang, J. A., & Wei, L. (2008). Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135(4), 799-808. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.07.071
114. Iba, O., Matsubara, H., Nozawa, Y., Fujiyama, S., Amano, K., Mori, Y., Iwasaka, T. (2002). Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 106(15), 2019-2025.
115. Iruela-Arispe, M. L., & Dvorak, H. F. (1997). Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost*, 78(1), 672-677.
116. Jain, R. K., Schlenger, K., Hockel, M., & Yuan, F. (1997). Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*, 3(11), 1203-1208.
117. Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Pertl, C. (2003). Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res*, 14(5), 578-583.

IX. Literaturverzeichnis

118. Jan Behrends, J. B., Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings. (2012). *Duale Reihe Physiologie* (2 ed.). Stuttgart Thieme Verlag.
119. Kaelin, W. G., Jr., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
120. Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Amano, K., Iba, O., Iwasaka, T. (2002). Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(11), 1804-1810.
121. Kanno, T., Takahashi, T., Tsujisawa, T., Ariyoshi, W., & Nishihara, T. (2005). Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg*, 63(3), 362-369. doi:10.1016/j.joms.2004.07.016
122. Kawasaki, S., Mori, M., & Awai, M. (1989). Capillary growth of rat aortic segments cultured in collagen gel without serum. *Acta Pathol Jpn*, 39(11), 712-718.
123. Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129(3), 465-472. doi:10.1016/j.cell.2007.04.019
124. Kelly, B. D., Hackett, S. F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Semenza, G. L. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*, 93(11), 1074-1081. doi:10.1161/01.Res.0000102937.50486.1b
125. Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., & Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(2), 189-204.
126. Kim, D. H., Je, Y. J., Kim, C. D., Lee, Y. H., Seo, Y. J., Lee, J. H., & Lee, Y. (2011). Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol*, 23(4), 424-431. doi:10.5021/ad.2011.23.4.424
127. Klein, M., Probst, C., Richter, N.-O., Zotz, R., Schulte, H. D., & Gams, E. (2001). Die präoperative autologe Thrombozytapherese zur Reduktion homologer Bluttransfusionen in der Herzchirurgie. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 15(2), 43-49. doi:10.1007/s003980170040
128. Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., Nishida, M., Ikenaga, S., Hirata, K., Esato, K. (2002). Angiogenesis induced by the injection of peripheral leukocytes and platelets. *J Surg Res*, 103(2), 279-286. doi:10.1006/jsre.2001.6309

IX. Literaturverzeichnis

129. Kolar, P., Gaber, T., Perka, C., Duda, G. N., & Buttgerit, F. (2011). Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res*, 469(11), 3118-3126. doi:10.1007/s11999-011-1865-3
130. Kozlik, M., & Wojcicki, P. (2014). The use of stem cells in plastic and reconstructive surgery. *Adv Clin Exp Med*, 23(6), 1011-1017. doi:10.17219/acem/37360
131. Krebs, H. (2008). *Praxis der Eigenbluttherapie* (5 ed.): Elsevier Verlag.
132. Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer*, 2(12), 1117-1133. doi:10.1177/1947601911423654
133. Kubo, M., Li, T. S., Kamota, T., Ohshima, M., Qin, S. L., & Hamano, K. (2009). Increased expression of CXCR4 and integrin alphaM in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency. *J Cell Physiol*, 220(2), 508-514. doi:10.1002/jcp.21803
134. Kubo, M., Li, T. S., Suzuki, R., Shirasawa, B., Morikage, N., Ohshima, M., Hamano, K. (2008). Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(2), H590-595. doi:10.1152/ajpheart.00856.2007
135. Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107(4), 1589-1598.
136. Kusumanto, Y. H., Dam, W. A., Hospers, G. A., Meijer, C., & Mulder, N. H. (2003). Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis*, 6(4), 283-287. doi:10.1023/B:AGEN.0000029415.62384.ba
137. Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T., & Ono, M. (2001). Angiogenesis factors. *Intern Med*, 40(7), 565-572.
138. Laderoute, K. R., Alarcon, R. M., Brody, M. D., Calaoagan, J. M., Chen, E. Y., Knapp, A. M., Giaccia, A. J. (2000). Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 6(7), 2941-2950.
139. Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., & Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*, 129(1), 203-217.
140. Landesberg, R., Burke, A., Pinsky, D., Katz, R., Vo, J., Eisig, S. B., & Lu, H. H. (2005). Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist

IX. Literaturverzeichnis

- peptide. *J Oral Maxillofac Surg*, 63(4), 529-535.
doi:10.1016/j.joms.2004.12.007
141. Landesberg, R., Roy, M., & Glickman, R. S. (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 58(3), 297-300; discussion 300-291.
142. Lawler, P. R., & Lawler, J. (2012). Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006627. doi:10.1101/cshperspect.a006627
143. Lee, G. S., Filipovic, N., Lin, M., Gibney, B. C., Simpson, D. C., Konerding, M. A., Mentzer, S. J. (2011). Intravascular pillars and pruning in the extraembryonic vessels of chick embryos. *Dev Dyn*, 240(6), 1335-1343. doi:10.1002/dvdy.22618
144. Leitner, G. C., Gruber, R., Neumuller, J., Wagner, A., Kloimstein, P., Hocker, P., Buchta, C. (2006). Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang*, 91(2), 135-139. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00815.x
145. Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Vasilic, N., & Kenney, E. B. (2002). Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol*, 73(2), 198-205. doi:10.1902/jop.2002.73.2.198
146. Leor, J., Rozen, L., Zuloff-Shani, A., Feinberg, M. S., Amsalem, Y., Barbash, I. M., Danon, D. (2006). Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation*, 114(1 Suppl), I94-100. doi:10.1161/circulationaha.105.000331
147. Levenberg, S., Rouwkema, J., Macdonald, M., Garfein, E. S., Kohane, D. S., Darland, D. C., Langer, R. (2005). Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol*, 23(7), 879-884. doi:10.1038/nbt1109
148. Levy, A. P. (1999). A cellular paradigm for the failure to increase vascular endothelial growth factor in chronically hypoxic states. *Coron Artery Dis*, 10(6), 427-430.
149. Li, S., Zhou, B., & Han, Z. C. (2006). Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb Haemost*, 95(2), 301-311. doi:10.1160/th05-06-0442
150. Lichtenauer, M., Mildner, M., Hoetzenecker, K., Zimmermann, M., Podesser, B. K., Sipos, W., Ankersmit, H. J. (2011). Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. *Basic Res Cardiol*, 106(6), 1283-1297. doi:10.1007/s00395-011-0224-6

IX. Literaturverzeichnis

151. Liekens, S., De Clercq, E., & Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61(3), 253-270.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00529-3)
152. Linser und Mayer, A. (1910). Ein Versuch, Schwangerschaftstoxikosen durch Eku spritzungen von Schwangerschaftsserum zu heilen. *Münchener medizinische Wochenschrift*(52), 2757.
153. Lipman, N. S., & Homberger, F. R. (2003). Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems. *Lab Anim (NY)*, 32(5), 36-43.
doi:10.1038/labani0503-36
154. LOGES, S., RONCAL, C., & CARMELIET, P. (2009). Development of targeted angiogenic medicine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), 21-33.
doi:doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03203.x
155. Lord, M. S., Cheng, B., Farrugia, B. L., McCarthy, S., & Whitelock, J. M. (2017). Platelet Factor 4 Binds to Vascular Proteoglycans and Controls Both Growth Factor Activities and Platelet Activation. *J Biol Chem*, 292(10), 4054-4063. doi:10.1074/jbc.M116.760660
156. Lubkowska, A., Dolegowska, B., & Banfi, G. (2012). Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents*, 26(2 Suppl 1), 3s-22s.
157. Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. B., & Antoniades, H. N. (1987). Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21), 7696-7700.
158. Madri, J. A., Pratt, B. M., & Tucker, A. M. (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 106(4), 1375-1384.
159. Mahon, P. C., Hirota, K., & Semenza, G. L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, 15(20), 2675-2686.
doi:10.1101/gad.924501
160. Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40(2), 294-309.
doi:10.1016/j.molcel.2010.09.022
161. Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., & Statkov, P. R. (1971). Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science*, 173(3996), 548-550.
162. Maloney, J. P., Silliman, C. C., Ambruso, D. R., Wang, J., Tuder, R. M., & Voelkel, N. F. (1998). In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol*, 275(3 Pt 2), H1054-1061.

IX. Literaturverzeichnis

163. Martinez-Zapata, M. J., Marti-Carvajal, A. J., Sola, I., Exposito, J. A., Bolibar, I., Rodriguez, L., Zaror, C. (2016). Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*(5), Cd006899. doi:10.1002/14651858.CD006899.pub3
164. Marx, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4), 489-496.
165. Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(6), 638-646.
166. Maulik, N., & Thirunavukkarasu, M. (2008). Growth factors and cell therapy in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol*, 44(2), 219-227. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.012
167. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275. doi:10.1038/20459
168. Mayer, A. (1911). Normales Schwangerenserum als Heilmittel gegen Schwangerschaftsdermatosen im besonderen und Schwangerschaftstoxikosen überhaupt. *Zentralbl. f. Gynäk.*
169. McCourt, M., Wang, J. H., Sookhai, S., & Redmond, H. P. (1999). Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg*, 134(12), 1325-1331; discussion 1331-1322.
170. Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive Angiogenesis: Expansion and Remodeling of Microvascular Networks. *Angiogenesis*, 17(3), 499-509. doi:10.1007/s10456-014-9428-3
171. Messori, M. R. e. a. (2011). A standartized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO*. *RSBO*, 8(3), 299-304.
172. Midwood, K. S., Williams, L. V., & Schwarzbauer, J. E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1031-1037. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.003
173. Milkiewicz, M., Pugh, C. W., & Egginton, S. (2004). Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. *J Physiol*, 560(Pt 1), 21-26. doi:10.1113/jphysiol.2004.069757
174. Molloy, T., Wang, Y., & Murrell, G. (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5), 381-394. doi:10.2165/00007256-200333050-00004
175. Montesano, R., Mossaz, A., Ryser, J. E., Orci, L., & Vassalli, P. (1984). Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly

IX. Literaturverzeichnis

- organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. *J Cell Biol*, 99(5), 1706-1715.
176. Nagata, M. J., Messori, M. R., Furlaneto, F. A., Fucini, S. E., Bosco, A. F., Garcia, V. G., de Melo, L. G. (2010). Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent*, 4(4), 395-402.
177. Nakatsu, M. N., & Hughes, C. C. (2008). An optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 443, 65-82. doi:10.1016/s0076-6879(08)02004-1
178. Nangaku, M., Izuhara, Y., Takizawa, S., Yamashita, T., Fujii-Kuriyama, Y., Ohneda, O., Miyata, T. (2007). A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 2548-2554. doi:10.1161/atvbaha.107.148551
179. Nehls, V., Herrmann, R., & Huhnken, M. (1998). Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodeling is regulated by basic fibroblast growth factor. *Histochem Cell Biol*, 109(4), 319-329.
180. Nicosia, R. F. (2009). The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(10), 4113-4136. doi:doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00891.x
181. Nicosia, R. F., Bonanno, E., & Villaschi, S. (1992). Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta. *Atherosclerosis*, 95(2-3), 191-199.
182. Nicosia, R. F., & Ottinetti, A. (1990). Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 63(1), 115-122.
183. Nicosia, R. F., & Villaschi, S. (1995). Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 73(5), 658-666.
184. Nicosia, R. F., Zorzi, P., Ligresti, G., Morishita, A., & Aplin, A. C. (2011). Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model. *Int J Dev Biol*, 55(4-5), 447-453. doi:10.1387/ijdb.103222m
185. Nissanov, J., Tuman, R. W., Gruver, L. M., & Fortunato, J. M. (1995). Automatic vessel segmentation and quantification of the rat aortic ring assay of angiogenesis. *Lab Invest*, 73(5), 734-739.
186. Okazaki, K., & Maltepe, E. (2006). Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen Med*, 1(1), 71-83. doi:10.2217/17460751.1.1.71
187. Oudelaar, B. W., Peerbooms, J. C., Huis in 't Veld, R., & Vochteloo, A. J. H. (2019). Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich

IX. Literaturverzeichnis

- Plasma Separation Systems: A Review of the Literature. *The American Journal of Sports Medicine*, 47(2), 479-487. doi:10.1177/0363546517746112
188. Ozturk, A., Kucukardali, Y., Tangi, F., Erikci, A., Uzun, G., Bashekim, C., Oktenli, C. (2012). Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *J Diabetes Complications*, 26(1), 29-33. doi:10.1016/j.jdiacomp.2011.11.007
189. Pajusola, K., Kunnappu, J., Vuorikoski, S., Soronen, J., Andre, H., Pereira, T., Alitalo, K. (2005). Stabilized HIF-1alpha is superior to VEGF for angiogenesis in skeletal muscle via adeno-associated virus gene transfer. *Faseb j*, 19(10), 1365-1367. doi:10.1096/fj.05-3720fje
190. Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., & Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(2), E313-322. doi:10.1152/ajpendo.90296.2008
191. Panutsopoulos, D., Zafiroopoulos, A., Krambovitis, E., Kochiadakis, G. E., Igoumenidis, N. E., & Spandidos, D. A. (2003). Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. *J Transl Med*, 1(1), 6. doi:10.1186/1479-5876-1-6
192. Pardanaud, L., Yassine, F., & Dieterlen-Lievre, F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development*, 105(3), 473-485.
193. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J. A., Sackstein, R., & Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 5431-5436. doi:10.1073/pnas.0701152104
194. Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117, 3-32.
195. Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ*, 15(4), 628-634. doi:10.1038/cdd.2008.17
196. Paul U. Unschuld, H. T. (2011). *Huang Di Nei Jing Su Wen: An Annotated Translation of Huang Di's Inner Classic - Basic Questions*: University of California Press.
197. Penn, J. W., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2012). The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*, 2(1), 18-28.
198. Phelps, E. A., & Garcia, A. J. (2009). Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen Med*, 4(1), 65-80. doi:10.2217/17460751.4.1.65

IX. Literaturverzeichnis

199. Pichiule, P., & LaManna, J. C. (2002). Angiopoietin-2 and rat brain capillary remodeling during adaptation and deadaptation to prolonged mild hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 93(3), 1131-1139. doi:10.1152/jappphysiol.00318.2002
200. Plendl, J., Neumuller, C., Vollmar, A., Auerbach, R., & Sinowatz, F. (1996). Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anat Embryol (Berl)*, 194(5), 445-456.
201. Posnett, J., Gottrup, F., Lundgren, H., & Saal, G. (2009). The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *J Wound Care*, 18(4), 154-161. doi:10.12968/jowc.2009.18.4.41607
202. Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873-887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
203. Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9(6), 677-684. doi:10.1038/nm0603-677
204. Puxeddu, I., Alian, A., Piliponsky, A. M., Ribatti, D., Panet, A., & Levi-Schaffer, F. (2005). Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3), 628-636. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.001
205. Reher, P., Doan, N., Bradnock, B., Meghji, S., & Harris, M. (1999). Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine*, 11(6), 416-423. doi:10.1006/cyto.1998.0444
206. Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43. doi:10.1159/000339613
207. Remensnyder, J. P., & Majno, G. (1968). Oxygen gradients in healing wounds. *The American Journal of Pathology*, 52(2), 301-323.
208. Rey, S., & Semenza, G. L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res*, 86(2), 236-242. doi:10.1093/cvr/cvq045
209. Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol*, 372(2), 157-165. doi:10.1016/j.ydbio.2012.09.018
210. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671. doi:10.1038/386671a0
211. Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 73-91. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000445
212. Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 434-441. doi:https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009

IX. Literaturverzeichnis

213. Schmidt, R. (1912). Über Arzneimittel der unspezifischen Proteinkörpertherapie. *Med. Klinik*, 922.
214. Schulte, W. (1960). Die Eigenblutfüllung: eine neue Methode zur Versorgung größerer Knochendefekte nach intraoralen Eingriffen. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 12, 910-914
215. Schulte, W. (1964). Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung für die primäre Heilung von Kieferknochen.
216. Schulte, W. (1969). Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte - eine Modifikation der Eigenblutmethode. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 10, 854-857.
217. Sclafani, A. P. (2009). Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg*, 25(4), 270-276. doi:10.1055/s-0029-1242033
218. Sclafani, A. P. (2011). Safety, efficacy, and utility of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*, 13(4), 247-251. doi:10.1001/archfacial.2011.3
219. Sclafani, A. P., & McCormick, S. A. (2012). Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. *Arch Facial Plast Surg*, 14(2), 132-136. doi:10.1001/archfacial.2011.784
220. Selvin, E., & Erlinger, T. P. (2004). Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*, 110(6), 738-743. doi:10.1161/01.Cir.0000137913.26087.F0
221. Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, 8(5), 588-594.
222. Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology*, 19(4), 176-182. doi:10.1152/physiol.00001.2004
223. Semenza, G. L. (2004). O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* (1985), 96(3), 1173-1177; discussion 1170-1172. doi:10.1152/jappphysiol.00770.2003
224. Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5447-5454.
225. Shanaman, R., Filstein, M. R., & Danesh-Meyer, M. J. (2001). Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21(4), 345-355.

IX. Literaturverzeichnis

226. Shyu, K. G., Wang, M. T., Wang, B. W., Chang, C. C., Leu, J. G., Kuan, P., & Chang, H. (2002). Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res*, 54(3), 576-583.
227. Siddiq, A., Aminova, L. R., & Ratan, R. R. (2007). Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochem Res*, 32(4-5), 931-946. doi:10.1007/s11064-006-9268-7
228. Sieveking, D. P., & Ng, M. K. (2009). Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med*, 14(2), 153-166. doi:10.1177/1358863x08098698
229. Simons, M. (2005). Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*, 111(12), 1556-1566. doi:10.1161/01.Cir.0000159345.00591.8f
230. Smith, C. W., Binford, R. S., Holt, D. W., & Webb, D. P. (2007). Quality assessment of platelet rich plasma during anti-platelet therapy. *Perfusion*, 22(1), 41-50. doi:10.1177/0267659107077950
231. Spero, J. A. (1993). Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients. Report of three cases. *J Neurosurg*, 78(5), 817-820. doi:10.3171/jns.1993.78.5.0817
232. Spiethoff, B. (1915). Methode und Wirkung der Eigenblutbehandlung. *Med. Klinik*, 2.
233. Springer, M. L. (2006). A balancing act: therapeutic approaches for the modulation of angiogenesis. *Curr Opin Investig Drugs*, 7(3), 243-250.
234. Stammers, A. H., Trowbridge, C. C., Marko, M., Woods, E. L., Brindisi, N., Pezzuto, J., Petzold, J. (2009). Autologous platelet gel: fad or savoir? Do we really know? *J Extra Corpor Technol*, 41(4), P25-30.
235. Stegmann, T. J., Hoppert, T., Schneider, A., Gemeinhardt, S., Kocher, M., Ibing, R., & Strupp, G. (2000). [Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors. A new therapeutic approach in coronary heart disease]. *Herz*, 25(6), 589-599.
236. Stockwell, R. A. (1991). Morphometry of cytoplasmic components of mammalian articular chondrocytes and corneal keratocytes: species and zonal variations of mitochondria in relation to nutrition. *J Anat*, 175, 251-261.
237. Takaku, M., Tomita, S., Kurobe, H., Kihira, Y., Morimoto, A., Higashida, M., . . . Tamaki, T. (2012). Systemic preconditioning by a prolyl hydroxylase inhibitor promotes prevention of skin flap necrosis via HIF-1-induced bone marrow-derived cells. *PLoS One*, 7(8), e42964. doi:10.1371/journal.pone.0042964

IX. Literaturverzeichnis

238. Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., & Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 65(3), 550-563. doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.002
239. Tatsumi, T., Ashihara, E., Yasui, T., Matsunaga, S., Kido, A., Sasada, Y., Matsubara, H. (2007). Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*, 71(8), 1199-1207.
240. Tegley, C. M., Viswanadhan, V. N., Biswas, K., Frohn, M. J., Peterkin, T. A., Chang, C., Hungate, R. W. (2008). Discovery of novel hydroxy-thiazoles as HIF-alpha prolyl hydroxylase inhibitors: SAR, synthesis, and modeling evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(14), 3925-3928. doi:10.1016/j.bmcl.2008.06.031
241. Tenan, M., Fulci, G., Albertoni, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., El Atifi-Borel, M., Van Meir, E. G. (2000). Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med*, 191(10), 1789-1798.
242. Teng, M., Huang, Y., & Zhang, H. (2014). Application of stems cells in wound healing--an update. *Wound Repair Regen*, 22(2), 151-160. doi:10.1111/wrr.12152
243. Trowbridge, C. C., Stammers, A. H., Woods, E., Yen, B. R., Klayman, M., & Gilbert, C. (2005). Use of platelet gel and its effects on infection in cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol*, 37(4), 381-386.
244. Tsay, R. C., Vo, J., Burke, A., Eisig, S. B., Lu, H. H., & Landesberg, R. (2005). Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg*, 63(4), 521-528. doi:10.1016/j.joms.2004.09.012
245. Uecker, D. M. (2016). Blut als Heilmittel - Grundlagen und Methoden der Eigenbluttherapie (3 ed.): ML Verlag Mediengruppe Oberfranken.
246. Vailhe, B., Vittet, D., & Feige, J. J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 81(4), 439-452.
247. van den Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A. P., Stoeltinga, P. J., & Jansen, J. A. (2006). Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng*, 12(11), 3067-3073. doi:10.1089/ten.2006.12.3067
248. van Weel, V., Seghers, L., de Vries, M. R., Kuiper, E. J., Schlingemann, R. O., Bajema, I. M., Quax, P. H. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor-1, and CXCR4 in human limb muscle with acute and chronic ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(6), 1426-1432. doi:10.1161/atvbaha.107.139642

IX. Literaturverzeichnis

249. Vernon, R. B., & Sage, E. H. (1995). Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol*, 147(4), 873-883.
250. Villaschi, S., & Nicosia, R. F. (1993). Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol*, 143(1), 181-190.
251. Vincent, K. A., Shyu, K. G., Luo, Y., Magner, M., Tio, R. A., Jiang, C., Isner, J. M. (2000). Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 102(18), 2255-2261.
252. Wagoner LE, M. W., Jacobs J, Conway G, Boehmer J, Thomas K, et al. (2007). Angiogenesis protein therapy with human Fibroblast Growth Factor (FGF-1): Results Of a phase i open label, dose escalation study in subjects with CAD not eligible for PCI or CABG. *Circulation*, 116(suppl_16), 443-450.
253. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514.
254. Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 268(29), 21513-21518.
255. Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *J Chin Med Assoc*, 81(2), 94-101.
doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002
256. Wei, L., Fraser, J. L., Lu, Z. Y., Hu, X., & Yu, S. P. (2012). Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis*, 46(3), 635-645. doi:10.1016/j.nbd.2012.03.002
257. Weibrich, G., Kleis, W. K., Hitzler, W. E., & Hafner, G. (2005). Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(1), 118-123.
258. Weller, C. D., Gardiner, E. E., Arthur, J. F., Southey, M., & Andrews, R. K. (2019). Autologous platelet-rich plasma for healing chronic venous leg ulcers: Clinical efficacy and potential mechanisms. *Int Wound J*.
doi:10.1111/iwj.13098
259. Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83(3), 835-870.
doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835

IX. Literaturverzeichnis

260. Whitman, D. H., & Berry, R. L. (1998). A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. *J Oral Maxillofac Surg*, 56(10), 1217-1218.
261. Xie, J., Bian, H., Qi, S., Xu, Y., Tang, J., Li, T., & Liu, X. (2008). Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. *Clin Exp Dermatol*, 33(2), 176-182. doi:10.1111/j.1365-2230.2007.02573.x
262. Yamamoto, A., Takahashi, H., Kojima, Y., Tsuda, Y., Morio, Y., Muramatsu, M., & Fukuchi, Y. (2008). Downregulation of angiopoietin-1 and Tie2 in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Respiration*, 75(3), 328-338. doi:10.1159/000112432
263. Yamamoto, K., Hayashi, J., Miyamura, H., & Eguchi, S. (1996). A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg*, 4(1), 9-14.
264. Yu, D., & Auerbach, R. (1999). Brain-specific differentiation of mouse yolk sac endothelial cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 117(2), 159-169.
265. Yuan, H. T., Li, X. Z., Pitera, J. E., Long, D. A., & Woolf, A. S. (2003). Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Am J Pathol*, 163(6), 2289-2301.
266. Yuksel, E. P., Sahin, G., Aydin, F., Senturk, N., & Turanli, A. Y. (2014). Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human facial skin. *J Cosmet Laser Ther*, 16(5), 206-208. doi:10.3109/14764172.2014.949274
267. Zechner, W., Tangl, S., Tepper, G., Furst, G., Bernhart, T., Haas, R., Watzek, G. (2003). Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18(1), 15-22.
268. Zetter, B. R. (1990). The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med*, 322(9), 605-612. doi:10.1056/nejm199003013220907
269. Zhang, W., Guo, Y., Kuss, M., Shi, W., Aldrich, A., Untrauer, J., Duan, B. (2019). Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tissue Infection: Preparation and Clinical Evaluation. *Tissue Eng Part B Rev*. doi:10.1089/ten.TEB.2018.0309
270. Zhu, W.-H., Iurlaro, M., MacIntyre, A., Fogel, E., & Nicosia, R. F. (2003). The Mouse Aorta Model: Influence of Genetic Background and Aging on bFGF- and VEGF-Induced Angiogenic Sprouting. *Angiogenesis*, 6(3), 193-199. doi:10.1023/B:AGEN.0000021397.18713.9c
271. Zou, D., Zhang, Z., Ye, D., Tang, A., Deng, L., Han, W., Jiang, X. (2011). Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone

IX. Literaturverzeichnis

marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Stem Cells*, 29(9), 1380-1390. doi:10.1002/stem.693

272. Zuloff-Shani, A., Kachel, E., Frenkel, O., Orenstein, A., Shinar, E., & Danon, D. (2004). Macrophage suspensions prepared from a blood unit for treatment of refractory human ulcers. *Transfus Apher Sci*, 30(2), 163-167. doi:10.1016/j.transci.2003.11.007

X. Anhang

A. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.a: zweiteilige Schablone aus 3D-Drucker, b. Schablone mit einliegender Mäuseaorta , c. Gebrauch der Schablone.....	23
Abb. 2: Querschnitt eines μ -Slide Angiogenesis, mit freundlicher Genehmigung der ibidi GmbH, ibidi.com.....	27
Abb. 3: PRP Herstellung.....	33
Abb. 4: Gedachte Einteilung des Aortenringes bei der Mikroskopie und Auswertung.....	35
Abb. 5: Visuelle Quantifizierung der Angiogenese im ARA.....	36
Abb. 6.a: Regelrechte Neovessels am Beispiel der Untersuchungsgruppe Plasma (Heparin) ohne Zentrifugation in 200-facher Vergrößerung, b. Nicht gewertete Strukturen aus migrierten Fibroblasten der Untersuchungsgruppe PRP aktiviert durch Thrombin.....	37
Abb. 7.a: Tube Formation Assay des Mediums HPS:PBS in der Verdünnung 1:50,exemplarische Markierung von Nodes (*) und Tubes (→), b. ausbleibende Ausbildung von Nodes und Tubes am Beispiel des Mediums PBS.....	38
Abb. 8: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich...42	
Abb. 9: Aortic Ring Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich....43	
Abb. 10: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 26 Jahre, männlich.....45	
Abb. 11: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....46	
Abb. 12: Tube Formation Assay verschiedener Medien, Blutspender 24 Jahre, weiblich.....47	
Abb. 13: Tube Formation Assay hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte unterschiedlicher Inkubationszeit, Blutspender 26 Jahre, männlich.....49	
Abb. 14: Tube Formation Assay hypoxisch präkonditionierter Blutprodukte unterschiedlicher Inkubationszeit, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....50	
Abb. 15: Aortic Ring Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich...52	

X. Anhang

Abb. 16: Tube Formation Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	54
Abb. 17: Tube Formation Assay verdünnten Plasmas, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	55
Abb. 18: Aortic Ring Assay von verdünntem HPP, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	56
Abb. 19: Tube Formation Assay von verdünntem HPP, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	58
Abb. 20: Tube Formation Assay von verdünntem HPP, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	59
Abb. 21: Aortic Ring Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	60
Abb. 22: Tube Formation Assay verdünnten Serums, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	62
Abb. 23: Tube Formation Assay verdünnten Serums, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	63
Abb. 24: Aortic Ring Assay von verdünntem HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	64
Abb. 25: Tube Formation Assay von verdünntem HPS, Blutspender 26 Jahre, männlich.....	66
Abb. 26: Tube Formation Assay von verdünntem HPS, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	67
Abb. 27: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+CaCl, Blutspender 27 Jahre, männlich.....	68
Abb. 28: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+CaCl, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	69
Abb. 29: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+Thrombin+CaCl, Blutspender 27 Jahre, männlich.....	71
Abb. 30: Tube Formation Assay von verdünntem PRP+Thrombin+CaCl, Blutspender 23 Jahre, weiblich.....	72

B. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht ausgewählter, an der Angiogenese beteiligter Wachstumsfaktoren und ihrer Funktion.....	4
Tab. 2: Übersicht aller getesteten Medien mit zugehöriger Methodik.....	38

XI. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank all denen, die mich im Laufe der Entstehung dieser Dissertation in jeglicher Art und Weise unterstützt haben.

Mein Dank gebührt meinem Partner Jonas, der mir in den Jahren zeitintensiver Laborarbeit den Rücken freigehalten hat, mich immer konstruktiv kritisiert und fortwährend fachübergreifend motiviert.

Besonders danke ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof Dr. Arndt Schilling und PD Dr. med. Hektor Hadjipanayi für die Überlassung des Themas, für ihre Ideen, die Unterstützung und ihr in mich gesetztes Vertrauen bei der Anfertigung dieser ausführlichen und anspruchsvollen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Machens danke ich für die Bereitstellung der nötigen Infrastruktur.

Weiterhin danke ich PD Dr. med. Ulf Dornseifer für die exzellente und unermüdliche Hilfe bei der mikrochirurgischen Präparation der vielen Mäuseaorten.

Nicht zu vergessen möchte ich mich auch bei Ursula Hopfner , Manuela Kirsch und Dr. med. Philipp Moog für die Einarbeitung in die experimentelle Forschung und die wertvollen Ratschläge während den Versuchsdurchführungen bedanken.

Vor allem aber danke ich meiner Familie für den umfassenden Rückhalt und meinen Eltern für die Unterstützung auf meinem Weg in die Chirurgie.