

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE
PROF. DR. CHRISTOF SCHMID
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Etablierung einer Methodik zur Konditionierung von Blutgefäßen im Durchflussmodel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ludwig Wiedemann

2010

AUS DER ABTEILUNG FÜR
HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE
PROF. DR. CHRISTOF SCHMID
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Etablierung einer Methodik zur Konditionierung von Blutgefäßen im Durchflussmodel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ludwig Wiedemann

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christof Schmid

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung.....	3
3	Liste der verwendeten Abkürzungen und Begriffe	3
4	Material und Methodik.....	4
4.1	Perfusions-/Superfusionsanlage	4
4.1.1	Bestandteile	5
4.1.1.1	Digitale Steuerungs- und Meßeinheit.....	6
4.1.1.2	Perfusionspumpe	7
4.1.1.3	Superfusionspumpe	8
4.1.1.4	Gasflussregulatoren 1-3.....	8
4.1.1.5	Aufnahmekonstruktion für einen Anlagenkreislauf (1-3).....	9
4.1.1.6	Kulturmediumreservoir 1-3.....	9
4.1.1.7	Oxygenator 1-3	11
4.1.1.8	Schlauchteil der Anlage 1-3	12
4.1.1.9	Dämpferspritzen 1-6.....	14
4.1.1.10	Organzylinder 1-3.....	15
4.1.1.11	Gefäßpräparatanschlussrohre.....	16
4.1.1.12	Gefäßeinbauvorrichtung.....	16
4.1.1.13	Rotationsmechanismus 1-3.....	17
4.1.1.14	Starling-Widerstand 1-3.....	18
4.1.1.15	Drucksensoren 1-6.....	20
4.1.1.16	Temperierungsanlage	21
4.1.1.17	Thermostaten	21
4.1.1.18	Wärmetauscher 1-6.....	21
4.1.1.19	Warmwasserkreisläufe	22
4.1.2	Betrieb der Anlage	23
4.1.2.1	Vorbereitung der Anlage	23
4.1.2.2	Inbetriebnahme	25
4.1.2.2.1	Befüllung mit Kulturmedium	25
4.1.2.2.2	Versuchsbereite Anlage	25
4.1.2.3	Einbau von Gefäßmaterial in den Organzylinder.....	26

4.1.2.4	Einbau des Organzylinders in den Anlagenkreislauf.....	27
4.1.2.5	Austausch des Kulturmediums.....	28
4.1.2.6	Mediumprobenentnahme	28
4.2	Untersuchungen zu unterschiedlichen Anlagen-Milieus.....	29
4.2.1	Versuchsablauf	29
4.2.2	Bioreaktor-Einstellungen	30
4.2.3	Medium	30
4.2.4	Gefäßmaterial: Rindervenens	31
4.2.4.1	Präparation des Gefäßmaterials	31
4.2.5	Analytische Methoden.....	32
4.2.5.1	Organbad	32
4.2.5.2	MTS-Reduktion	33
4.2.5.3	Histologie	34
4.2.5.4	Mediumprobenanalyse.....	35
4.2.5.5	Verwendete Reagenzien.....	37
4.2.5.6	Datenanalyse	37
5	Ergebnisse.....	38
5.1	Generelle Erkenntnisse für den Anlagenbetrieb.....	38
5.2	Versuche zum physiologischen Milieu	40
5.2.1	Luminaler Druck in Gruppe 3	40
5.2.2	Auswirkungen der unterschiedlichen physiologischen Milieus auf die Kontraktilität, (endothelabhängige) Relaxation und MTS-Reduktion der Rindervenens.....	40
5.2.2.1	Maximale Gefäßkontraktion nach Gabe von 150 mM Kaliumchlorid... 40	
5.2.2.2	Dosis-Wirkungskurven der Noradrenalininduzierten Kontraktion	41
5.2.2.3	(endothelabhängige) Gefäßrelaxation.....	44
5.2.2.4	MTS-Reduktion	49
5.2.3	Nährmediumprobenanalysen	50
5.2.3.1	Gaspartialdrücke	50
5.2.3.2	Dextrose, Laktat und pH.....	52
5.2.3.3	Elektrolyte	55
5.2.4	Histologie	62
6	Diskussion.....	64
7	Zusammenfassung	78

8	Literaturverzeichnis.....	79
9	Abbildungsverzeichnis	99
10	Tabellenverzeichnis.....	103
_____	Danksagung	105
_____	Lebenslauf	106

1 Einleitung

Die zunehmende Prävalenz der arteriosklerotischen Gefäßkrankheit bei steigendem Lebensalter führt dazu, dass die kardiale und periphere Gefäßkrankheit zu den häufigsten Todes- und Krankheitsursachen der westlichen Welt zählt. Auch wenn hier zur Behandlung mittlerweile endovaskuläre und minimalinvasive Verfahren wie die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) und Stenting zur Verfügung stehen, spielt die chirurgische Gefäßrekonstruktion immer noch eine bedeutende Rolle, insbesondere wenn es sich um die Therapie komplexer Gefäßveränderungen handelt oder nach Versagen der endovaskulären Methoden (1-3).

Hierfür stehen Gefäße unterschiedlichsten, allo-/auto-/xenogenen und artifiziellen, Ursprungs zur Verfügung. Den „Goldstandard“ als arteriellen Gefäßersatz stellt dabei im Bereich der unteren Extremität die autologe V. saphena magna dar (4), die A. mammaria interna im Bereich der Koronarbypässe (5). Gerade diese Gefäße stehen jedoch oft aus verschiedensten Gründen gar nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung (6; 7). Gefäße größeren Diameters, wie Beinarterien, können dann zwar durch künstliche Gefäße aus ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) oder Dacron® (polyethylene terephthalate) ersetzt werden, aber mit dem Nachteil einer deutlich verkürzten Haltbarkeit (8; 9). Bei Gefäßen mit kleinem Durchmesser, wie den Koronararterien, ist dieser Ersatz kaum sinnvoll, da diese, unter anderem wegen des Fehlens einer antithrombotischen Oberfläche, meist bedingt durch einen Verschluss, einen frühen Funktionsverlust aufweisen (10; 11). Auch biologische Gefäß-Transplantate wie kryokonservierte Venae saphenae (12), menschliche mit Glutaraldehyd dezellularisierte Umbilikalvenen (13-15) oder arterielle Allografts (16) zeigen viele Komplikationen und ein schlechtes Langzeit-Outcome, was sie für eine routinierte Anwendung auf diesem Gebiet unbrauchbar werden lässt.

Gründe für das frühe Versagen von kardiovaskulären ePTFE- u. Dacron-Prothesen im Einzelnen sind zunächst schlechte mechanische Eigenschaften (17; 18). Das Fehlen einer metabolisch aktiven, glattmuskelzell- und bindegewebsreichen Media mit der damit verbundenen Viskoelastizität stellt zusammen mit der Thrombogenität des Materials die zwei häufigsten Ursachen eines Gefäßprothesenversagens dar (19). Die beschriebene Materialthrombogenität ist zudem bedingt durch das Fehlen eines Endothels auf der luminalen Oberfläche (20). Ohne diesen endothelialen Zell-Monolayer fehlt ein wichtiger Bioregulator in der vaskulären Physiologie, welcher unter anderem auch bei der Virchow-Trias eine entscheidende Rolle spielt (21).

Denn das Endothel sorgt für eine strukturelle Integrität im Blutgefäß, indem es eine kontinuierliche selektiv permeable und thromboresistente Barriere zwischen zirkulierendem Blut und der übrigen Gefäßwand bildet. Außerdem hat es eine zentrale Funktion bei der Kontrolle von Blutfluss, Gefäßtonus (22), Blutplättchen-Aktivierung/-Adhäsion/-Aggregation (23), Leukozyten-Adhäsion (24) sowie Glattmuskelzell-Migration und -Proliferation (25). Zusätzlich zu diesen grundlegenden Eigenschaften wäre im Rahmen der Bypassanwendung eine gute Verträglichkeit, Resistenz gegen Infektionen und dazu die Verfügbarkeit verschiedener Durchmesser und Längen wünschenswert. Den derzeitigen vorhandenen künstlichen Gefäßen fehlen dabei jedoch „einheilende“ Eigenschaften, da das Einwachsen von Endothel- und Glattmuskelzellen etc. ausbleibt (26). Prinzipiell wären drei mögliche Wege für eine Endothelialisierung gegeben: über die Anastomose aus dem nativen Gefäß, transmural und über zirkulierende Progenitorzellen aus dem Blut (27). Jedoch zeigte sich bald, dass dies, bei den vor allem betroffenen Patienten älteren Jahrgangs und Diabetikern, in nicht erwähnenswertem Maßstab stattfand im Gegensatz zu Beobachtungen im Tiermodell (28).

Die Gewebezüchtung („tissue engineering“) betreibt nun die Herstellung von Gewebe oder Organersatz durch die Kombination von biologischen oder biokompatiblen Gerüsten mit autologen Zellen des Empfängers. Sie stellt damit einen möglichen Weg dar künstlichen Gefäßen all die geforderten Eigenschaften in großem Umfang bereits vor der Implantation an seinem endgültigen Bestimmungsort zu verleihen. Auf verschiedenste Art und Weise wird hier versucht die gewünschten Gefäße zu züchten bzw. vorhandenes Gefäßmaterial nach den oben genannten Maßstäben zu optimieren (29; 30). Ein zentrales Werkzeug stellen hierbei nun Bioreaktoren dar. Sie bieten *in vitro* eine dynamisch mechanische Umgebung, die in vielen Studien ein im Vergleich zu statischen Verhältnissen deutlich verbessertes Zell- und Gewebewachstum erkennen ließ (31; 32)

2 Problemstellung

Da im Bereich der Züchtung von Blutgefäßen die Vorteile von dynamischen in vitro Verhältnissen im Vergleich zu statischen bereits vielfach gezeigt wurden und die Suche nach einem vollwertigen Gefäßersatz zwar weltweit auf verschiedensten Wegen betrieben wird, jedoch eine in der Praxis in großem Maßstab anwendbare Alternative bis jetzt noch nicht gefunden wurde (33; 34), stellten sich für uns folgende Aufgaben bei der Entwicklung einer Methodik zur Konditionierung von Gefäßen im Durchflußmodell:

- Aufbau eines Bioreaktors, der auf Basis der Erkenntnisse aus der Literatur ein geeignetes Milieu für eine Blutgefäßkonditionierung zur Verfügung stellt
- Für zukünftige Forschungszwecke an Blutgefäßen und für das entsprechende „tissue engineering“ eine möglichst große Variabilität in der Erstellung unterschiedlicher Bioreaktormilieus
- Entwicklung einer Methodik für den routinemäßigen Einsatz der Anlage unter gewünschten Bedingungen unter besonderer Berücksichtigung der Sterilität
- Untersuchung inwiefern der Bioreaktor die genannten Aufgaben erfüllt anhand der Konditionierung von Rinderven in unterschiedlichen Bioreaktormilieus über 4 und 8 Tage

3 Liste der verwendeten Abkürzungen und Begriffe

FMI	= FÖHR MEDICAL INSTRUMENTS GMBH
Superfusion	= das Gefäßmaterial <i>umströmender</i> Fluss
Perfusion	= das Gefäßmaterial <i>durchströmender</i> Fluss
Da	= Diameter außen
Di	= Diameter innen
W	= Wanddicke
L	= Länge
NE	= Noradrenalin
ACh	= Acetylcholin
SNP	= Natrium-Nitroprussid
OD	= Optische Dichte
pO ₂	= Sauerstoffpartialdruck (mmHg)
pCO ₂	= Kohlendioxidpartialdruck (mmHg)
pH	= pH-Wert
PAH	= pulmonalarterielle Hypertonie
MTS	= MTS-Reduktion
IRS	= Ischämie/Reperfusionsschaden

4 Material und Methodik

4.1 Perfusions-/Superfusionsanlage

Die komplette Anlage wurde von der FÖHR MEDICAL INSTRUMENTS GMBH (FMI) unter dem Namen „VPA-4300 Venen Perfusions- und Superfusions-Apparatur mit Rotationseinrichtung“ unseren Vorgaben entsprechend entwickelt. Der vorrangige Verwendungszweck sollte die Blutgefäßkonditionierung, z.B. die Transformation von Venen aus vorhandenem Nabelschnurmateriale durch Neuendothelialisierung und anschließend ansteigender Druckbelastung der Gefäßwand zu in einem arteriellen Kreislauf verwendbaren Gefäßen sein. Die Dauer des Versuchs wurde dabei auf 15-30 Tage veranschlagt, die Bedingungen mussten steril sein. Diesbezüglich wurden die Materialien und technischen Komponenten von FMI selektiert und dimensioniert. Die Validierung und Verifizierung bezüglich Eignung für entsprechende Projekte erfolgte von unserer Seite und stellt das Hauptziel dieser Dissertation dar. Im Folgenden werden die Anlage, ihre Bestandteile und Funktion erläutert. Die gesamte Anlage besteht aus drei voneinander getrennten Mediumkreisläufen, jeder beinhaltet dabei einen durchströmenden (Perfusion) und einen das Gefäßmaterial umströmenden (Superfusion) Mediumfluss. Einen ersten Überblick bieten Abbildung 1 und 2.

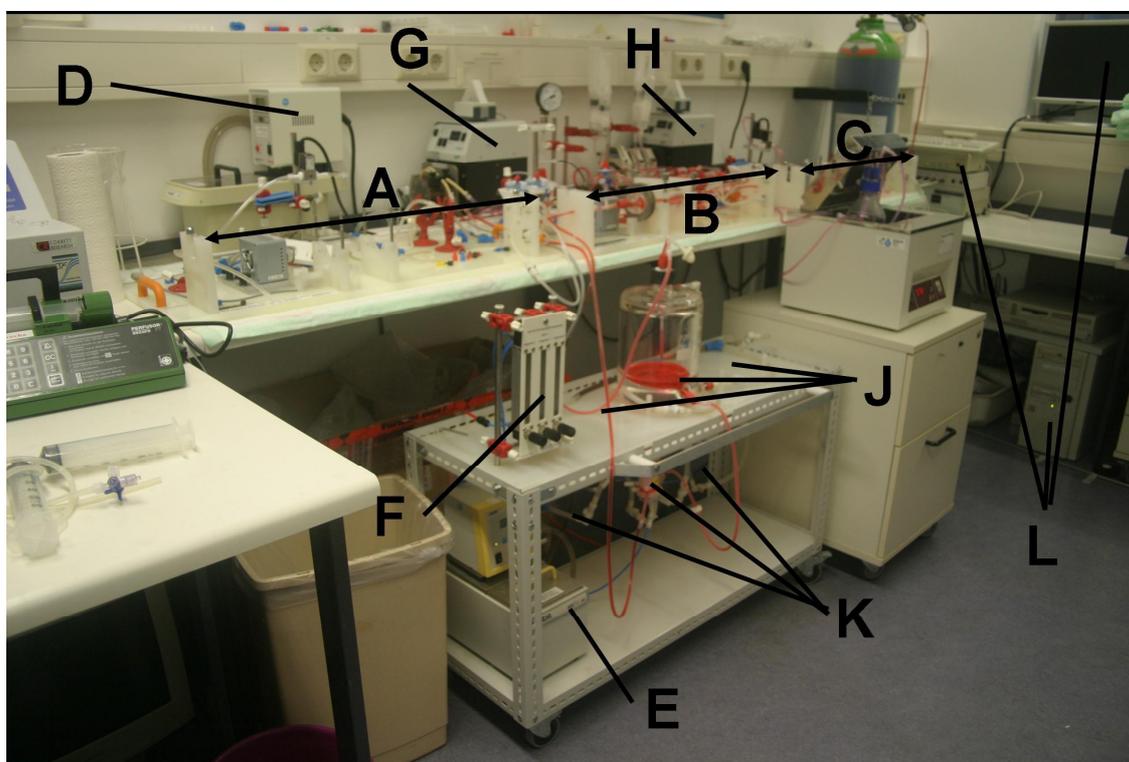


Abbildung 1 Überblick gesamte Perfusions-/Superfusionsanlage: **A-C** Kreislauf 1-3 **D-E** Thermostaten **F** Gasflussregulatoren **G** Superfusionspumpe **H** Perfusionspumpe **J** Kulturmediumreservoirstellplatz 1-3 **K** Oxygenatoraufhängung 1-3 **L** Digitale Steuerungs- und Meßeinheit

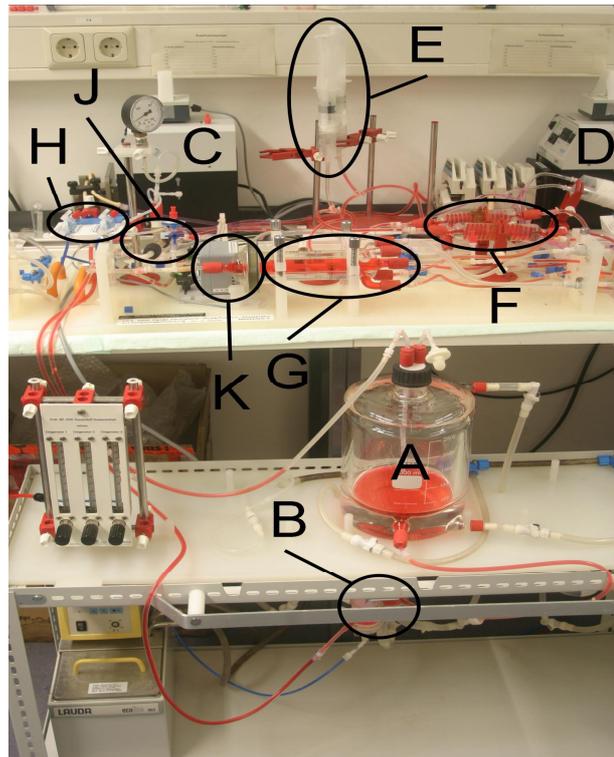
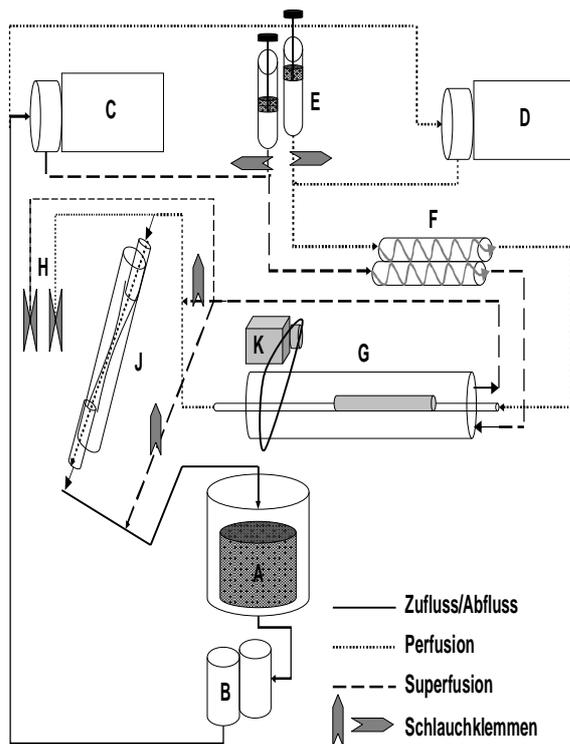


Abbildung 2 Ein Kreislauf mit seinen Bestandteilen: **A** Kulturmediumreservoir **B** Oxygenator **C** Superfusionspumpe **D** Perfusionspumpe **E** Dämpferspritzen **F** Wärmeaustauscher **G** Inkubationszylinder **H** Druckmesser **J** Starling-Widerstand **K** Rotationsmechanismus

4.1.1 Bestandteile

Die nachfolgenden Punkte beschreiben die einzelnen Komponenten der Anlage wie Sie in den Versuchen letztendlich zur Anwendung kamen. Da die Anlage drei Organzylinder, jeder nimmt jeweils ein Gefäßpräparat auf, mit entsprechend drei getrennten Kulturmedium-Kreisläufen umfasst (Abb. 1), liegen bestimmte Komponenten dreifach vor (Kennzeichnung 1-3). Ein Kreislauf (Abb. 2) teilt sich hierbei zusätzlich teilweise in eine das Gefäßpräparat durchfließende Perfusion und eine umfließende Superfusion auf, weshalb einige Bestandteile pro Kreislauf doppelt, d.h. insgesamt sechsfach vorliegen (Kennzeichnung 1-6). Das mit Kulturmedium zu füllende Volumen eines Kreislaufes exklusive Kulturmediumreservoir wurde auf etwa 180 ml bemessen. GL-Anschlüsse mit BOLA-Laborverschraubungen (Fa. Bohlender, Typ HT) für Glasgewinde verschiedener Größe (entspricht der Zahl nach GL) bieten die geeignete Aufnahme für Glasröhrchen geringeren Durchmessers bzw. von FEP-Schläuchen mit Luer-Lock-Anschlüssen (Abb. 6 und 10). An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass alle in dieser Arbeit verwendeten von den Herstellerfirmen vergebenen Namen entsprechender Bestandteile sowie die Namen der Herstellerfirmen selbst urheberrechtlich geschützt sind.

4.1.1.1 Digitale Steuerungs- und Meßeinheit

Die Datenakquisition und Prozesssteuerung erfolgt durch ein auf das Projekt abgestimmtes, PC-kompatibles, Online-Messdaten-Akquisitionsprogramm (VitroDat, FMI). Diese Software ermöglicht zum einen die Erfassung, visuelle Präsentation und Speicherung diverser Messwerte (Tab. 1),

1.	Perfusatdruck-Transducer 1 - 3, Min/Max/Mean mmHg
2.	Superfusatdruck-Transducer 1 - 3, Mean mmHg
3.	Druckdifferenz Perfusion/Superfusion 1 - 3, Mean mmHg (wird aus den Mittelwerten der jeweiligen Perfusat- und Superfusatdruckmessungen errechnet)
4.	Analogspannungssignale von Rotationsmotor 1-3 (bei aktiviertem Rotationsantrieb), 0,2 - 3,8 V (entsprechen 360° Rotation)

Tabelle 1 Mittels Datenakquisitionsoftware digital erfassbare, visuell präsentierbare und speicherbare Messwerte

zum anderen die Prozesssteuerung von zwei Schlauchpumpen hinsichtlich Fördermenge per externer Analogansteuerung (Tab. 2).

1.	Schlauchpumpe für Perfusat, 0 - 3 V entsprechend 0 - 530 ml/min limitiert
2.	Schlauchpumpe für Superfusat, 0 - 3 V entsprechend 0 - 240 ml/min limitiert

Tabelle 2 Digitale Prozesssteuerung der Schlaupumpen

Die Limitierung der Ansteuerungsvoltzahl also der Förderleistung erfolgt zur Vermeidung von Überdruck-Ereignissen im Anlagenkreislauf.

Die Schnittstelle zwischen PC und Drucktransducern bildet ein PC-kompatibler IBJ-AMP-08 Messverstärker. Hierbei wurde auf dem Motherboard des PCs, in einem PCI-Slot, eine Einschubkarte installiert, welche einen Multiplexer für bis zu 16 Kanäle, deren A/D (Analog/Digital-) Wandlung, sowie die Kommunikation mit einer externen, 8-Kanal Verstärker-/Transducer-Anschlussbox ermöglicht. So werden die von den Drucktransducern abgegebenen, druckproportionalen Spannungspegel im einstelligen Millivoltbereich digital erfasst. Alle benötigten Einstellungen für die Messverstärkung werden über ein Software-/Bildschirmmenü vorgenommen und als Default-Einstellungen abgespeichert. Dabei können verschiedene, anwendungsbezogene Einstellungen erstellt und gespeichert werden.

Als zusätzliche Analogsignale werden ohne weitere Verstärkung die Betriebssignale des Schrittmotor-Kontrollers von 0,2 bis 3,8 V über die PCI-Einschubkarte erfasst, digitalisiert und mit dem VitroDatWin Programm dargestellt. Die PCI-Einschubkarte

ist außerdem mit zwei Input/Output Kanälen ausgestattet, welche die Schnittstellen zur Regelung der zwei Schlauchpumpen bilden.



Abbildung 3 Digitale Steuerungs- und Meßeinheit

4.1.1.2 Perfusionspumpe

Ein Standardschlauchpumpenantrieb (BVP Standard, Ismatec) wurde mit drei Pumpenköpfen (Masterflex/Easy Load, Cole Parmer Instruments) bestückt, welche die Pumpenschläuche ($D_i = 8 \text{ mm}$, $W = 1,6 \text{ mm}$, $D_a = 11,2 \text{ mm}$, Pharmed/Ismaprene, Ismatec) der drei Kreisläufe aufnehmen. Ein auf der Oberseite der Pumpe befestigtes Umschaltkästchen ermöglicht mittels Kippschalter die Auswahl zwischen manueller Bedienung über das Bedienfeld des Standardantriebs und Fernbedienung durch das PC-Programm VitroDat (siehe 4.1.1.1). Über das PC-Programm kann eine in ml/min definierte Flussrate von minimal 2,4 ml/min bis maximal 530 ml/min erzielt werden. Über die Perfusionspumpe werden als Folge des Schlauchpumpenprinzips außerdem die Basispulse als Grundlage für physiologische Pulscurven generiert. Puls- und Flussrate sind entsprechend direkt von einander abhängig (Tab. 3) und laut Herstellerangaben annähernd direkt proportional. Aus den von FMI bestimmten Werten der Tabelle 3 lässt sich daher ein Koeffizient von etwa 0,7 errechnen mit dem eine eingestellte Flussrate multipliziert werden muss, um die entsprechende Pulsrate abschätzen zu können. Entsprechend kann durch Division einer gewünschten

Pulsrate mit 0,7 die hierfür notwendig Flussrate berechnet werden. Die weitere Definition der Pulskurven erfolgt über die Dämpferspritzen (siehe 4.1.1.9).

Pulse / Minute	70	110	140
Volumen (ml) / Minute	96	154	184

Tabelle 3 Beispiele für das gegenseitige Abhängigkeitsverhältnis von Puls- und Flussrate der Perfusion (Werte von FMI bestimmt)

4.1.1.3 Superfusionspumpe

Ihr Antrieb entspricht dem der Perfusionspumpe, ist jedoch mit einem anderen Pumpenkopf für die dünneren Pumpenschläuche ($D_i = 3,2$ mm, $W = 1,6$ mm, $D_a = 6,4$ mm, Pharmed/Ismaprene, Ismatec) der Superfusion ausgestattet. Die Flussrate kann von 2,4 ml/min bis maximal 240 ml/min variiert werden. Ansonsten gelten die gleichen Merkmale wie für die Schlauchpumpe der Perfusion (siehe 4.1.1.2).

4.1.1.4 Gasflussregulatoren 1-3

Über einen dreifach Schlauchverteiler (FMI) werden drei Nadelventile mit Schwebkörperanzeige (FMI) mit der Gasquelle verbunden. Diese leiten über Drehregler und Gasflussanzeige genau definierte Gasmengen (0 - 1000 ml/min) den drei Oxygenatoren zu.

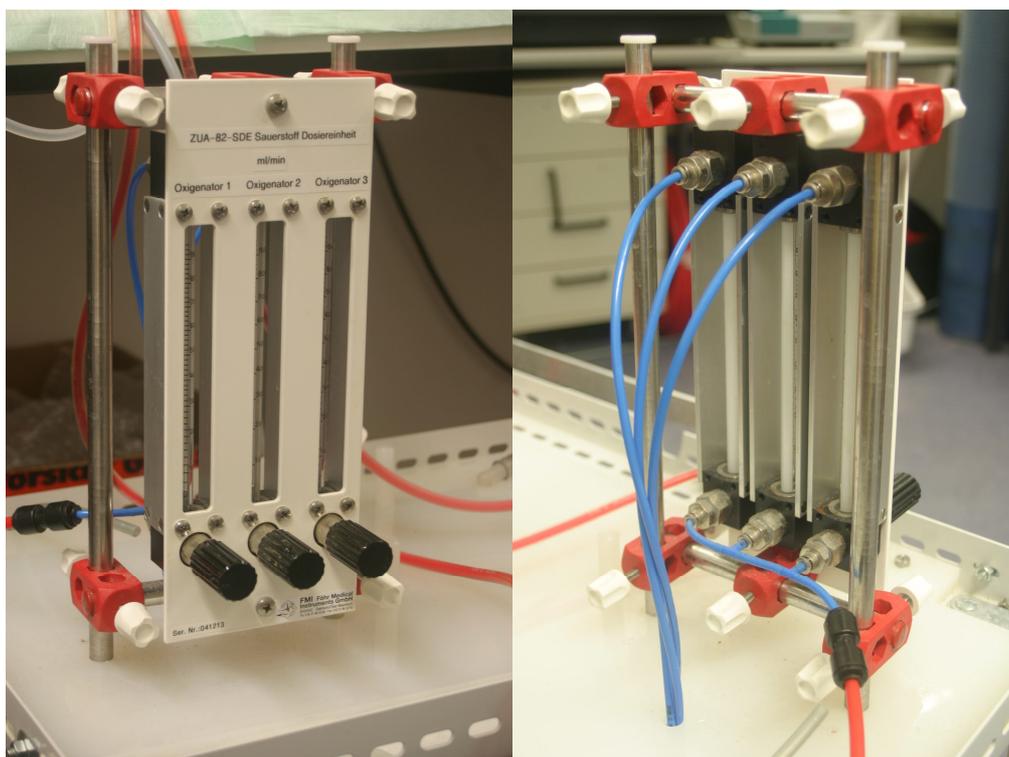


Abbildung 4 Gasflussregulator 1-3 für Oxygenator 1-3

4.1.1.5 Aufnahmekonstruktion für einen Anlagenkreislauf (1-3)

Die Basis der Aufnahmekonstruktion für einen Kreislauf bildet eine Platte aus leicht zu reinigendem Polypropylen (FMI). Auf ihr sind Halterungen (FMI) für Schlauchteil, Wärmetauscher, Organzylinder, Rotationsmotor, Infrarotsensor, Drucktransducer u. Starling-Widerstand eines Kreislaufs montiert (Abb. 5). Die Befestigungen von Rotationsmotor u. Drucksensoren können dabei je nach Bedarf in unterschiedlichen Positionen erfolgen. Die Aufnahme des Organzylinders erfolgt für eine erleichterte Rotation rollengelagert. Der zum Kreislauf gehörige Oxygenator und Kulturmediumbehälter sind in der Nähe des zugehörigen Temperierungskreislaufs und des Gasflussregulators positioniert (Abb. 1). Alle Komponenten sind leicht auf der Vorrichtung zu installieren und zu entfernen.

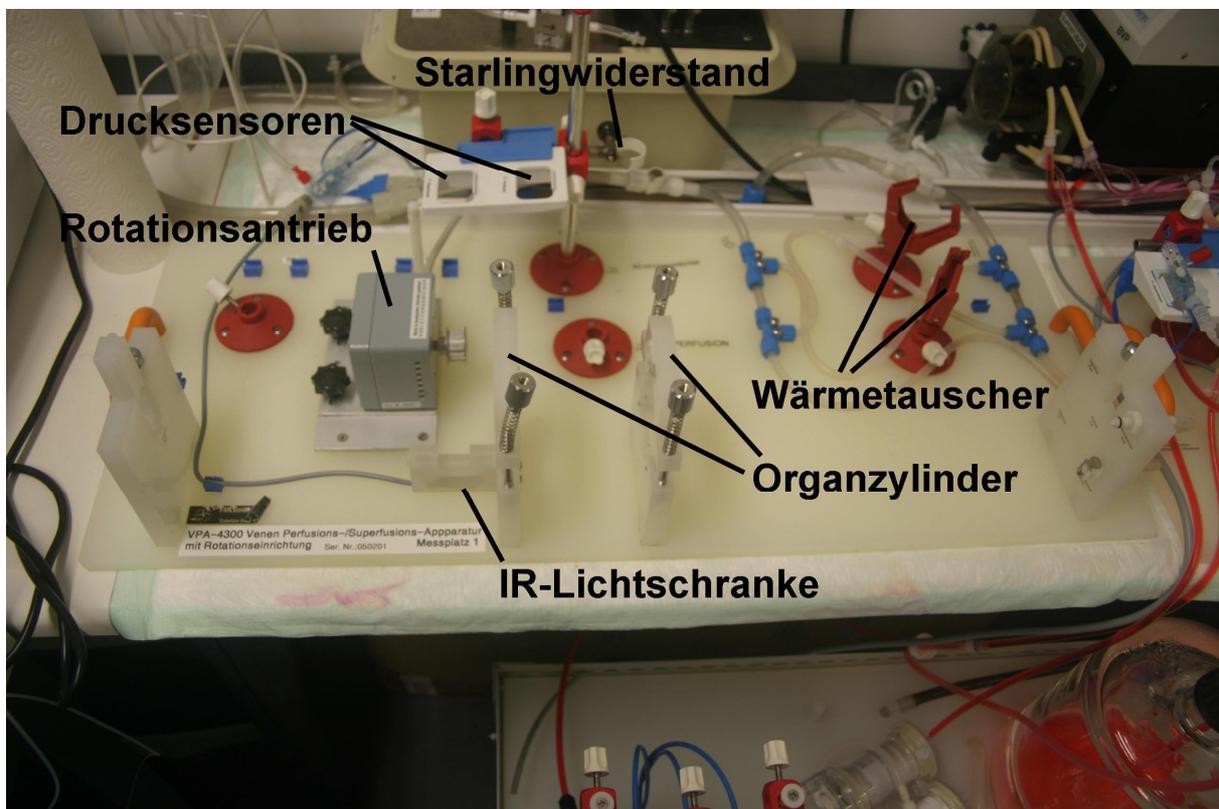


Abbildung 5 Aufnahmekonstruktion eines Kreislaufs für die angegebenen Bestandteile

4.1.1.6 Kulturmediumreservoir 1-3

Für einen mehrwöchigen Versuchsablauf ist die Anlage mit einem doppelten Satz von Kulturmediumreservoirs ausgestattet, d.h. von insgesamt sechs Flaschen sind drei an jeweils einem der drei Kreisläufe angeschlossen, während die anderen drei mit neuem Kulturmedium befüllt werden können. Alle Komponenten stammen von der Firma FMI. Die Flaschen sind doppelwandig, wodurch das Kulturmedium, durch Umspülung mit Wasser aus einem Thermostaten mit Pumpe, physiologisch

temperiert werden kann. Der Boden des inneren, eigentlichen Kulturmedium Reservoirs (maximales Volumen 2,5 l) ist schräg gestaltet, so dass die Flüssigkeit restlos auslaufen und kein „Sumpf“ entstehen kann. Der Kulturmediumauslauf und -rücklauf, die Warmwasseranschlüsse sowie Flaschenbelüftungs- bzw. druckausgleichsanschlüsse (atmosphärischer Druck) sind als GL 14 Anschlüsse ausgeführt. Ein- u. Ausfluss für das Kulturmedium wurden zur Vereinfachung der späteren Verbindungsprozedur mit der übrigen Anlage mit kurzen, ca. 20 cm langen Silikonschläuchen (Di = 4 mm) versehen, welche an ihren Enden Luer-Lock-Verschlüsse aufweisen. Die tangentialen Warmwasser Zu- und Rücklaufe sind mit selbst sperrenden CPC Schnellkupplungen versehen, was ein Wechseln der Flaschen während des Betriebes ermöglicht. Der Flaschenhals ist als GL 45 Glasverschraubung ausgeführt und mit einer GL 45 Schraubkappe mit zweifachem GL 14 Ansatz ausgestattet. Diese beiden GL 14 Ansätze sind die schon erwähnten Anschlüsse für den Kulturmedium-Rückfluss und den atmosphärischen Druckausgleich. Letzterer wird dabei mit einem 0,2 µm Filter (Aerodisc Premium 25 mm, Life Sciences) verbunden, um ein Eindringen von Keimen zu verhindern. Bis auf die CPC Schnellkupplungen sind alle Komponenten autoklavierbar.

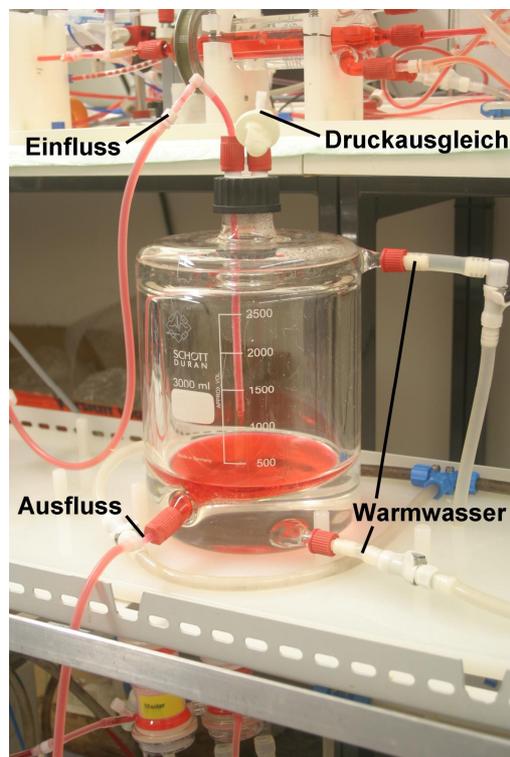


Abbildung 6 Kulturmediumreservoir eines Kreislaufs mit Anschlussbezeichnungen

4.1.1.7 Oxygenator 1-3

Zur Begasung des Kulturmediums dient pro Anlagenkreislauf ein mikroporöser Polypropylen-Hohlfaser-Oxygenator aus der neonatalen extrakorporalen Membranoxygenierung (Polystan SafeMicro, Jostra/Magnet). Die Anschlussstutzen für Kulturmedium-Zu- und Abfluss wurden für eine einfache Integration in den Anlagenkreislauf über kurze Silikonschlauchstücke (Di = 4 mm) mit Luer-Lock-Anschlüssen versehen. CPC-Schnellkupplungen an den entsprechenden Anschlüssen verbinden den Wärmetauscher des Oxygenators mit dem Warmwasserkreislauf der Anlage (siehe 4.1.1.16). Durch Warmwasser-Beheizung erfolgt die Oxygenierung bei physiologischen Temperaturen, was das spätere Ausgasen von Sauerstoffbläschen verhindert. Ein oben an den Begasungszylinder angeschlossener hydrophober 0,2 µm Filter (Aerodisc Premium 25 mm, Life Sciences) ermöglicht ein steriles Entlüften des Oxygenators während des Betriebs. Während die mit dem Oxygenator verbundenen Teile bis auf die CPC-Schnellkupplungen alle autoklavierbar sind, kann der Oxygenator für eine mehrfache Verwendung nur mit Ethylenoxid sterilisiert werden.

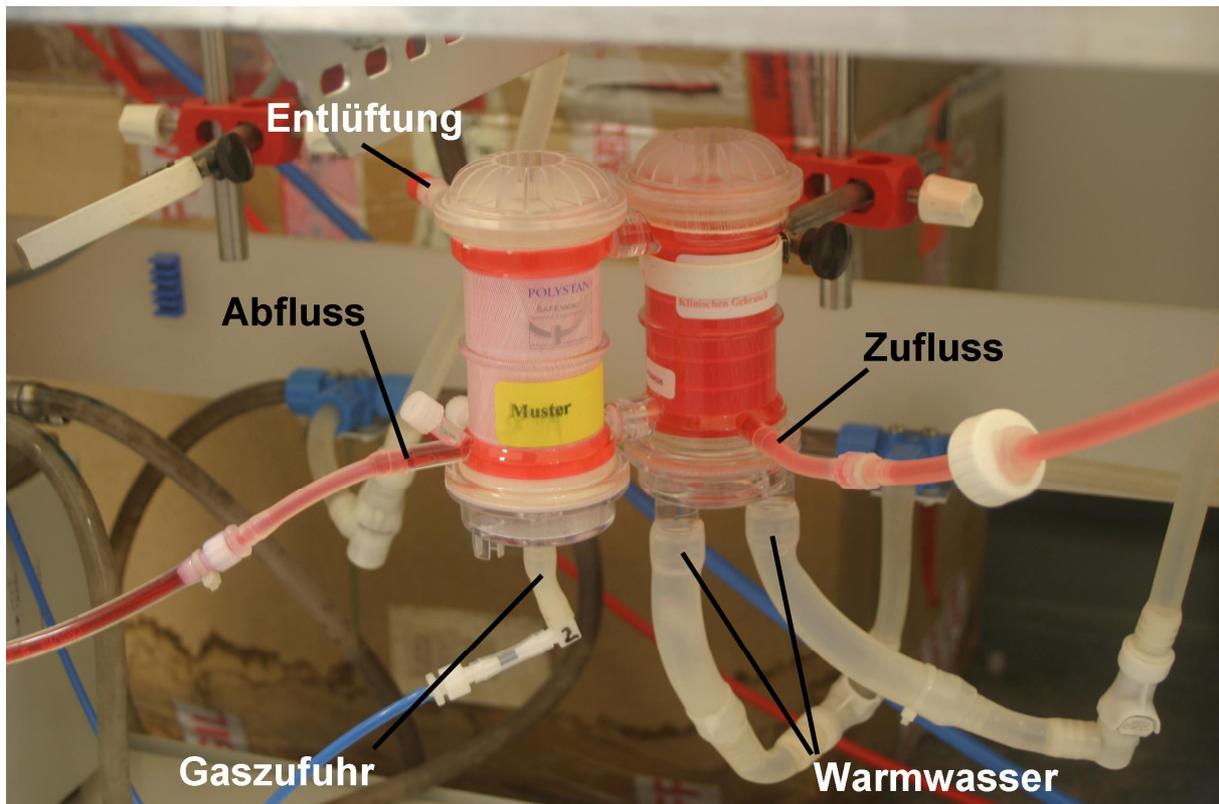


Abbildung 7 Oxygenator in seiner Aufhängung mit bezeichneten Anschlüssen

4.1.1.8 Schlauchteil der Anlage 1-3

Dieser besteht aus drei voneinander getrennten identischen Kultumediumkreisläufen, welche jeweils mit dem Perfusions- und dem Superfusionskreislauf den zentralen Teil der Anlage bilden in den die übrigen beschriebenen Bestandteile mittels standardisierten Luer-Lock-Anschlüssen für einen einfachen Zusammenbau bzw. Komponentenaustausch eingebunden werden. Abbildung 8 zeigt den Schlauchteil mit den Positionen der Komponenten eines Kreislaufes. Wie bereits erwähnt enthält die gesamte Anlage drei derartige Kreisläufe. Die meisten Komponenten ließen sich mit Luer-Lock-Anschlüssen versehen, indem kurze FEP-Schlauchstücke mit Luer-Lock-Fitting über BOLA-Laborverschraubungen montiert wurden. Da die Glasröhrchen des Starling-Widerstandes und des Organzylinders (Gefäßpräparatanschlussrohre) sowie die Anschluss-Stutzen des Oxygenators diese Möglichkeit nicht bieten, werden diese über einen dickwandigen Silikon-Übergangsschlauch ($D_i = 4 \text{ mm}$) mit Luer-Lock-Anschlüssen versehen. Außer diesen Schlauchstücken und den Pumpenschläuchen (siehe 4.1.1.2 und 4.1.1.3) bestehen die restlichen Schläuche komplett aus Tygon. Diese Materialwahl ist erforderlich, da ausführliche Vorversuche zeigten, dass die Gaspermeabilität von Silikonschläuchen einen zu großen Gasverlust bedeutete. Der Schlauchteil eines Anlagenkreislaufes setzt sich im Einzelnen wie folgt zusammen: Über ein T-Stück ($D_i = 4 \text{ mm}$) wird der gemeinsame Zuflussschlauch ($D_i = 4 \text{ mm}$) nach Oxygenierung in Perfusat- ($D_i = 4 \text{ mm}$) und Superfusatschlauch ($D_i = 3,2 \text{ mm}$) aufgeteilt, welche nach Passage ihrer Schlauchpumpen, Dämpferspritzen und Wärmetauscher in den Organzylinder münden. Danach werden über T-Stücke Abzweigungen zu den jeweiligen Drucksensoren geschaffen. Perfusion und Superfusion vereinigen sich schließlich, wiederum über ein T-Stück, vor dem Starling-Widerstand. Als Besonderheit kann das Superfusat an diesem durch einen Umgehungsschlauch ($D_i = 3.2 \text{ mm}$), der mit entsprechenden T-Verteilern vor und hinter dem Starling-Widerstand verbunden ist vorbeigeleitet werden. Hierfür muss die Schlauchklemme des Umgehungsschlauches (X in Abb. 8) geöffnet und der Verbindungsschlauch zur Perfusion vor dem Starling-Widerstand durch die dortige Klemme (Y in Abb. 8) geschlossen werden. Durch Umkehrung der jeweiligen Klemmung wird auch die Superfusion dem Starling-Widerstand ausgesetzt. Ein gemeinsamer Abflussschlauch ($D_i = 4 \text{ mm}$) führt schließlich zurück zum Kulturmedium-Reservoir. Für einen vereinfachten Einbau sind die Luer-Lock-Verbindungen für den Anschluss von Wärmetauscher, Organzylinder und Starling-Widerstand farblich gekennzeichnet

(Perfusion = rot, Superfusion = grün, Starling-Widerstand = schwarz; siehe Abb. 6).
Alle Schlauchteile, einschließlich der Pumpenschläuche, sind autoklavierbar.

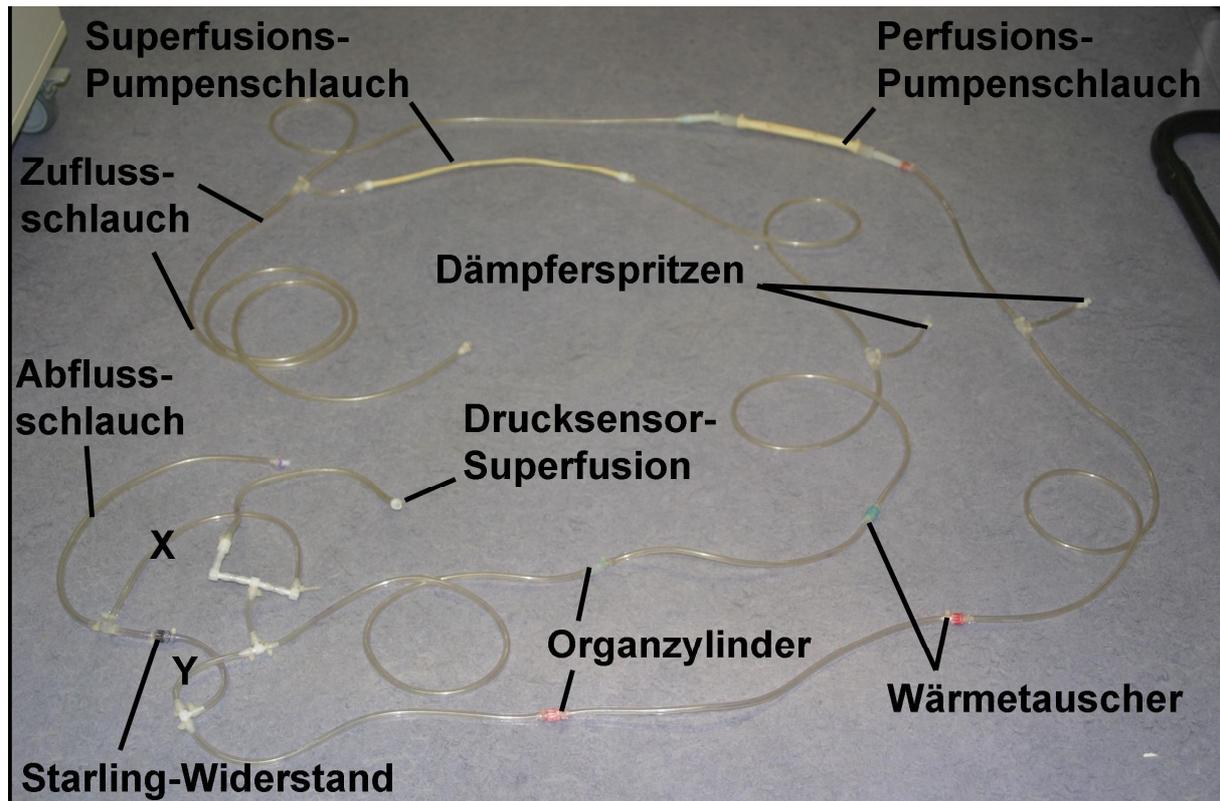


Abbildung 8 Schlauchteil eines Anlagenkreislaufs mit Bezeichnung der Positionen der jeweiligen Kreislaufkomponenten und der Schlauchklemmen zur Einstellung einer Superfusion mit bzw. ohne Starling-Widerstand; X = Schlauchklemme am Starling-Widerstand-Umgehungsschlauches der Superfusion; Y = Schlauchklemme des Verbindungsschlauches zwischen Superfusion und Perfusion unmittelbar vor dem Starling-Widerstand. Der Drucksensoranschluss der Perfusion stellt einen Teil des Starling-Widerstandes (Abb. 10) dar und ist daher nicht abgebildet.

4.1.1.9 Dämpferspritzen 1-6

Für Super- und Perfusion eines Kreislaufes wird je eine Dämpferspritze (Abb. 9), maximales Volumen 50 ml, benötigt um die Druck-Spitzen und -Tiefen hervorgerufen durch die Schlauchpumpen, selektiv für jeden einzelnen Kreislauf, auf z.B. physiologische systolische bzw. diastolische Werte abzdämpfen. Bei ausreichendem Dämpfervolumen können die durch die Pumpen hervorgerufenen Strömungsschwankungen auch auf eine annähernd gleichbleibende Strömung ausgeglichen werden. Die Spritzen werden senkrecht über Anlagenkreislaufhöhe an einer Klemmvorrichtung (FMI) angebracht, die Spritzenstempel bei gewünschtem Dämpfervolumen mit einfachem Klebeband fixiert (Abb. 9). Um den Sterilitätsanforderungen gerecht zu werden, wurden hierfür Einweg-Spritzen mit Luer-Lock-Anschlüssen, für eine stabile Verbindung mit dem Anlagenkreislauf, verwendet.



Abbildung 9 Dämpferspritzen der Per- und Superfusion in der entsprechenden Halterung

4.1.1.10 Organzylinder 1-3

Für die besonderen Applikationsbedingungen und Betriebszustände wurde hier eine besondere Glaskonstruktion von FMI für jeden Anlagenkreislauf entwickelt (Abb. 10). In einen Glaszylinder wurde ein Glasrohr kleineren Durchmessers mit GL 14 Anschlüssen eingeschmolzen. Für eine gleichmäßige Zell-Inkubation des eingespannten Gefäßmaterials wurde der Zylinder außerdem auf der einen Seite mit einer Zahnriemenscheibe, die einen schlupffreien Rotationsantrieb (siehe 4.1.1.13) gewährleistet, versehen. Neben den beiden GL 14 Anschlüssen links und rechts, die über entsprechende BOLA-Laborverschraubungen die Venenpräparat-Anschlussrohre aufnehmen, befinden sich am zahnriemenfreien Ende des äußeren Glaszylinders vier GL 14 Anschlüsse. Zwei davon sind über eingeschmolzene Glasröhrchen mit dem Lumen zwischen äußerem Glaszylinder und innerem Glasrohr verbunden und sind damit über BOLA-Laborverschraubungen mit Luer-Lock-Anschlüssen Ein- und Ausfluss des Wärmekreislaufs. Die anderen Beiden, Ein- und Ausfluss der Superfusion, sind entsprechend mit dem inneren Glasrohr konnektiert. Für eine reibungsarme 360° Rotation wird jeder Organzylinder während des Betriebs in zwei Lagerböcken (Eigenkonstruktion FMI) mit jeweils drei Rollenlagern, welche mittels Federkraft einen moderaten Anpressdruck ausüben, fixiert. Die Organzylinder sind komplett autoklavierbar.

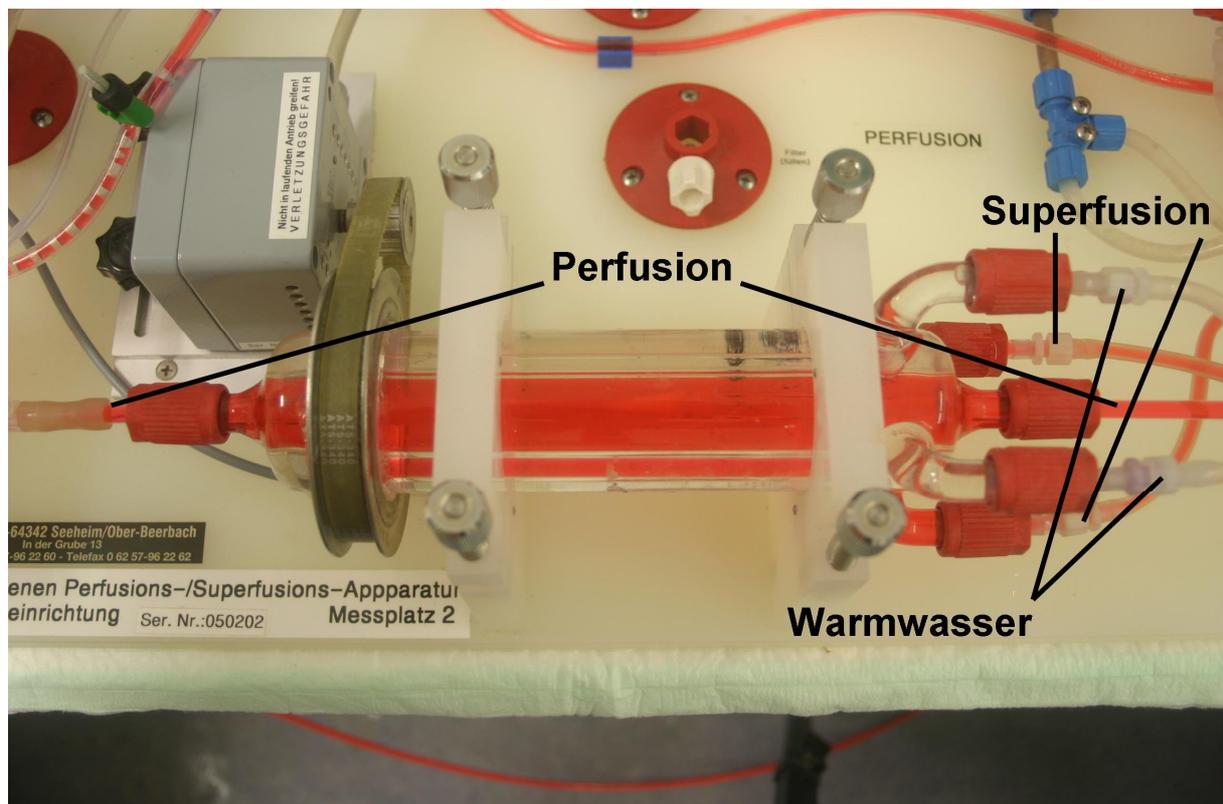


Abbildung 10 Organzylinder mit Anschlussbezeichnungen

4.1.1.11 Gefäßpräparatanschlussrohre

Um eine größtmögliche Kompatibilität zu künstlichen und organischen Gefäßpräparaten zu gewährleisten, wurden von FMI Anschlussrohre mit unterschiedlichen Außendurchmessern und Längen hergestellt (Tab. 4; Abb. 11).

A.	Da = 6 mm, L = 100 & 200 mm Fixierungseinschliff für Silikonschnur-Mehrfachligatur an einem Ende
B.	Da = 6 mm, L = 85 & 185 mm einseitig verjüngt auf Da = 5 mm * L = 15 mm Fixierungseinschliff für Silikonschnur-Mehrfachligatur am verjüngten Ende
C.	Da = 6 mm, L = 85 & 185 mm einseitig verjüngt auf Da = 4 mm * L = 15 mm Fixierungseinschliff für Silikonschnur-Mehrfachligatur am verjüngten Ende

Tabelle 4 verfügbare Gefäßpräparatanschlussrohre

Der Innendurchmesser beträgt immer 4 mm. Die Fixierungsschliffe, welche das Abrutschen des mit Silikonfadenwicklung befestigten Gefäßmaterials verhindern (siehe 4.1.1.12), mit einer Tiefe von 0,2 bis 0,25 mm auf eine Breite von 2,5 mm sind in die äußere Glaswand eingebracht. Sowohl bei den im Durchmesser durchlaufenden, als auch bei den im Durchmesser endständig reduzierten Rohren ist somit eine laminare Strömung garantiert, da keine Verengung nach Innen gegeben ist. Die Integration in den Anlagenkreislauf erfolgt durch T-Stücke, welche durch ein flexibles Silikonschlauchstück ($D_i = 4$ mm) mit den Röhren verbunden werden. Die anderen beiden Enden sind mit Luer-Lock-Anschlüssen versehen, wobei der 90° zu den beiden anderen Enden des T-Stücks stehende Luer-Lock-Anschluss für die Entnahme von Kultumediumproben bzw. Einspritzung von Flüssigkeiten, z.B. Zellmaterial, dient. Glasröhrchen und T-Stücke sind vollständig autoklavierbar.

4.1.1.12 Gefäßeinbauvorrichtung

Basis dieser Konstruktion (FMI, Abb. 9) ist eine Platte aus leicht zu reinigendem und autoklavierbarem Polypropylen. Zentral ist eine Aufnahme für eine Petrischale (enthält später gewünschtes präpariertes Gefäßmaterial) eingelassen. Links u. Rechts hiervon befindet sich jeweils eine Klemmvorrichtung für ein Gefäßpräparatanschlussrohr (siehe 4.1.1.11) und gegenüber dem Benutzer die Silikonfaden-Halterungen aus Edelstahl. Letztere nehmen in ihrem kranialen Schlitz den Silikonfaden auf. Ein dicker Knoten des Fadens am entsprechenden Ende verhindert ein Durchrutschen des Fadens. Mit Hilfe des autoklavierbaren Silikonfadens, genauer ein sehr dünner Silikonschlauch ($D_a = 0,5$ mm, $D_i = 0,3$ mm;

Beiersdorf AG), wird gewünschtes Gefäßmaterial durch mehrfache Umwicklung auf den Gefäßpräparatanschlussrohren mit gleichmäßigem Druck fixiert.

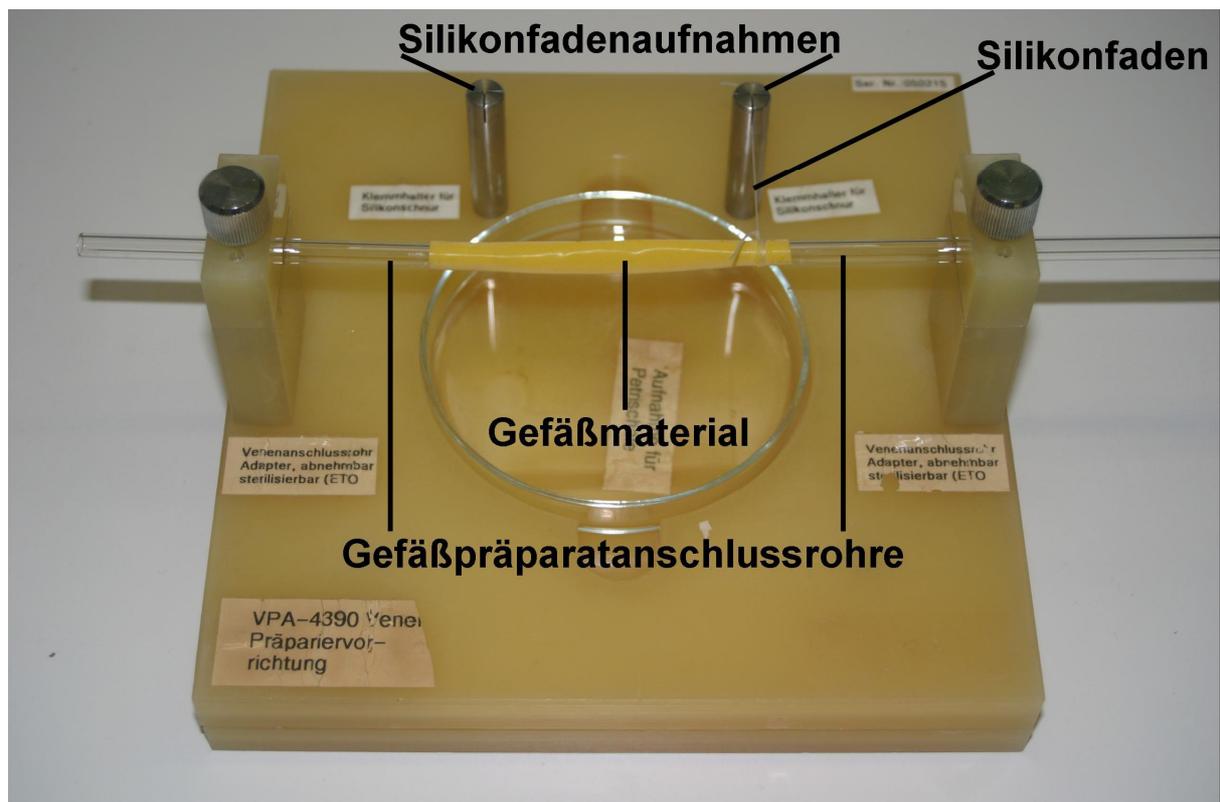


Abbildung 11 Gefäßmaterialeinbauvorrichtung

4.1.1.13 Rotationsmechanismus 1-3

Alle Komponenten stammen von FMI. Dieser Mechanismus besteht aus einem Zahnriemenantrieb (PU-Zahnriemen), dadurch ist eine schlupffreie Rotation des Organzylinders gewährleistet, dessen größeres Rad auf dem Organzylinder befestigt ist (Abb. 10). Das kleinere Rad ist auf der Schrittmotorachse montiert (Abb. 5, 10). Die Anzahl der Zähne beträgt 16:48, was einem Untersetzungsverhältnis von 1:3 entspricht. Die Schrittmotoren für jeden Anlagenkreislauf sind zwei Phasen Schrittmotoren für 24 V Betriebsspannung und 1,8° Phasenwinkel (= 200 Schritte für eine volle 360° Umdrehung). Da diese Motoren bei längerer Betriebsdauer eine Eigenerwärmung von über 60°C erreichen, wurden sie in ein stabiles Aluminium Druckgussgehäuse eingebaut. Um die Motorwärme abzuführen, ist das Gehäuse mit zahlreichen Bohrungen (außer Oberseite) und einem 24V-Radiallüfter ausgestattet. Abweichungen der Schrittmotoren im Rotationsbetrieb werden von IR-Lichtschranken erkannt. Diese sind unterhalb der am Organzylinder adaptierten Zahnriemenscheibe als Linksausleger an der linken Aufnahme des Organzylinders montiert (Abb. 5). Bei aktivierter Rotation fällt durch den Schlitz in den beiden Bordscheiben links und

rechts des Zahnriemenrades für einige Millisekunden ein Lichtstrahl auf den gegenüberliegenden Fotodetektor. Die Verarbeitung dieser Signale der drei Lichtschranken und die Kontrolle der drei Schrittmotoren erfolgt durch einen Mikroprozessor im Schrittmotorkontroller (VPA-4300-SRI-MOT-CONT-3M, DeMeTec). Neben der Korrektur von Rotationsabweichungen können hier die Schrittmotoren 1-3 einzeln angewählt, aktiviert bzw. deaktiviert sowie deren jeweilige Rotationsgeschwindigkeit (U/min, min. 4) und die Anzahl an Rotationen eingestellt werden. Nach 360° wird hierbei automatisch die Rotationsrichtung gewechselt, um eine Aufwicklung der mit dem Organzylinder verbundenen Schläuche zu vermeiden. Für jeden aktivierten Schrittmotor wird an einer BNC-Buchse ein Analogsignal von 0,2 - 3,8 V (0,2 V zur Vermeidung von Nullpotential Artefakten) ausgegeben, dessen Differenzspannung von 3,6 V eine 360° Rotation repräsentiert. Diese Ausgangsbuchse wird zur Registrierung der Rotationsdauer mit dem Hardwareingang des VitroDat PC-Systems (siehe 4.1.1.1) verbunden.

4.1.1.14 Starling-Widerstand 1-3

Ein permanent selbst regelnder, pneumatischer Druckgenerator (KAL-100, Halstrup-Walcher) wird zur manuell einstellbaren, automatischen Druckkontrolle von den drei Starling-Widerständen jedes Anlagenkreislaufs verwendet. Der Arbeitsbereich ist von 0 – 1000 mmHg einstellbar. Ein dreifach Schlauchverteiler verbindet diese Druckquelle mit den Starling-Widerständen. Ein Starling-Widerstand (Abb. 12) besteht aus einem Glas T-Stück (FMI) mit horizontal zwei GL 18 Anschlüssen. Durch Letztere ist jeweils ein Glasröhrchen ($D_a = 6 \text{ mm}$, $L = 60 \text{ mm}$, $D_i = 5 \text{ mm}$) gesteckt, welches am inneren Ende auf einen Außendurchmesser von 8 mm aufgebördelt ist (FMI). Über die inneren Enden dieser Glasröhrchen ist ein umgestülpter (Riefen nach Außen) „Silikon-Penrose-drain“ Schlauch ($D_i = 6 \text{ mm}$, $L = 75 \text{ mm}$; FMI) aufgezogen und mit einem kräftigen Baumwollfaden (Handgarn) durch mehrere Windungen, sehr fest angezogen und fest verknotet, fixiert. Die äußeren Enden der Glasröhrchen sind mit einem dickwandigen Silikon-Übergangsschlauch ($D_i = 4 \text{ mm}$) mit den davor und dahinter platzierten Luer-Lock-Anschlüssen verbunden. Die dritte vertikale Öffnung des Glas T-Stücks wird über einen GL 14 Anschluss mit einem T-Stück, welches zwei Luer-Lock-Anschlüsse besitzt, verschraubt. An diese werden der Druckgenerator (siehe oben; A in Abb. 12) und ein Kapselfeder-Manometer (FMI; C in Abb. 12), für die Kontrolle der „After-Load“ Belastung, angebracht. Durch den Druckgenerator kann nun auf den oben beschriebenen „Silikon-Penrose-drain“ ein definierter Druck ausgeübt werden, der auf dem Manometer angezeigt wird. Der komprimierte „Silikon-Penrose-drain“ stellt einen Strömungswiderstand für das

hindurchlaufende Kulturmedium dar. Da dieser Widerstand im Anlagen-Kreislauf dem perfundierten Gefäß nachgeschaltet ist, kann das Gefäß so spezifischen „After-Loads“ von 0 bis >300 mmHg (entspricht dem maximal bestimmbar Wert der verwendeten Druckmesser, siehe 4.1.1.15) ausgesetzt werden. Der von innen auf das Gefäß wirkende Druck kann durch die Möglichkeit des Superfusates den Starling-Widerstand zu umgehen (siehe 4.1.1.8) weiter erhöht werden, da sich so die Druckdifferenz zwischen Venenlumen und Umgebung steigern lässt. Die Starling-Widerstände sind autoklavierbar. Hierfür müssen die druckregulierenden Einheiten entfernt werden.

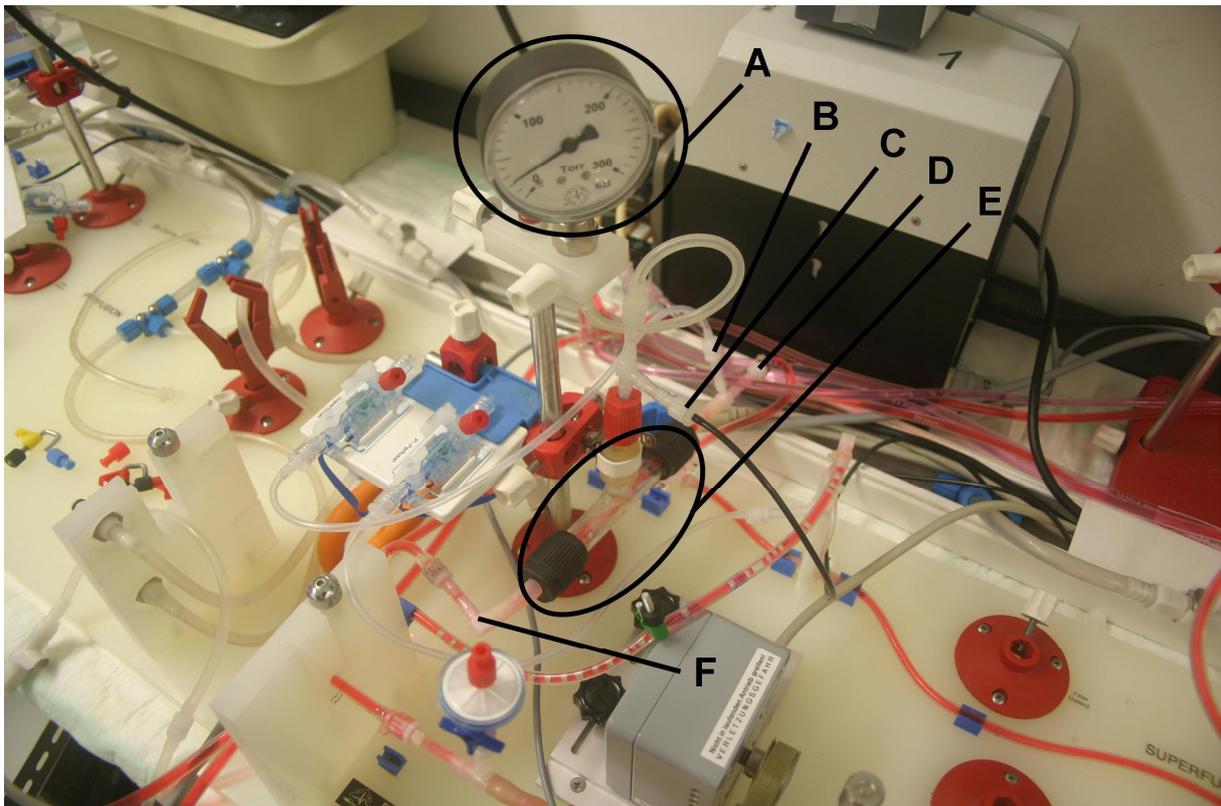


Abbildung 12 Starling-Widerstand mit Bezeichnung von Bestandteilen und Anschlüssen:
A Kapselmanometer **B** Drucksensoranschluss der Perfusion **C** Anschluss des Druckgenerators
D Einfluss **E** Starling-Widerstand **F** Ausfluss

4.1.1.15 Drucksensoren 1-6

Zur Kontrolle und für die Einstellung von Betriebsdrücken jedes einzelnen Anlagenkreislaufs werden kostengünstige Einweg-Drucksensoren (TBD-1222, FMI) mit einem Messbereich von +/- 300 mmHg eingesetzt. Die Speisung mit 5 V Gleichstrom und die Verstärkung des druckproportionalen Signals erfolgt mit den IBJ-AMP-08 Biosignalverstärkern über Anschlusskabel zur externen Verstärkerbox. Die Sensoren sind leicht austauschbar auf Montageplatten der Aufnahmekonstruktion (Abb. 5) in gewünschter Höhe platziert. Die Kalibrierung erfolgt mit Luft, z.B. mit einem manuellen Druckgeber, der mit einem Manometer ausgestattet ist (ähnlich einem manuellen Blutdruckmessgerät). Die Drucksensoren und die Anschlussschlauchstücke des Anlagenkreislaufs werden für ein korrektes Drucksignal blasenfrei mit Kulturmedium gefüllt bzw. entlüftet. Die Drucksensoren können nur mit Ethylenoxid sterilisiert werden.

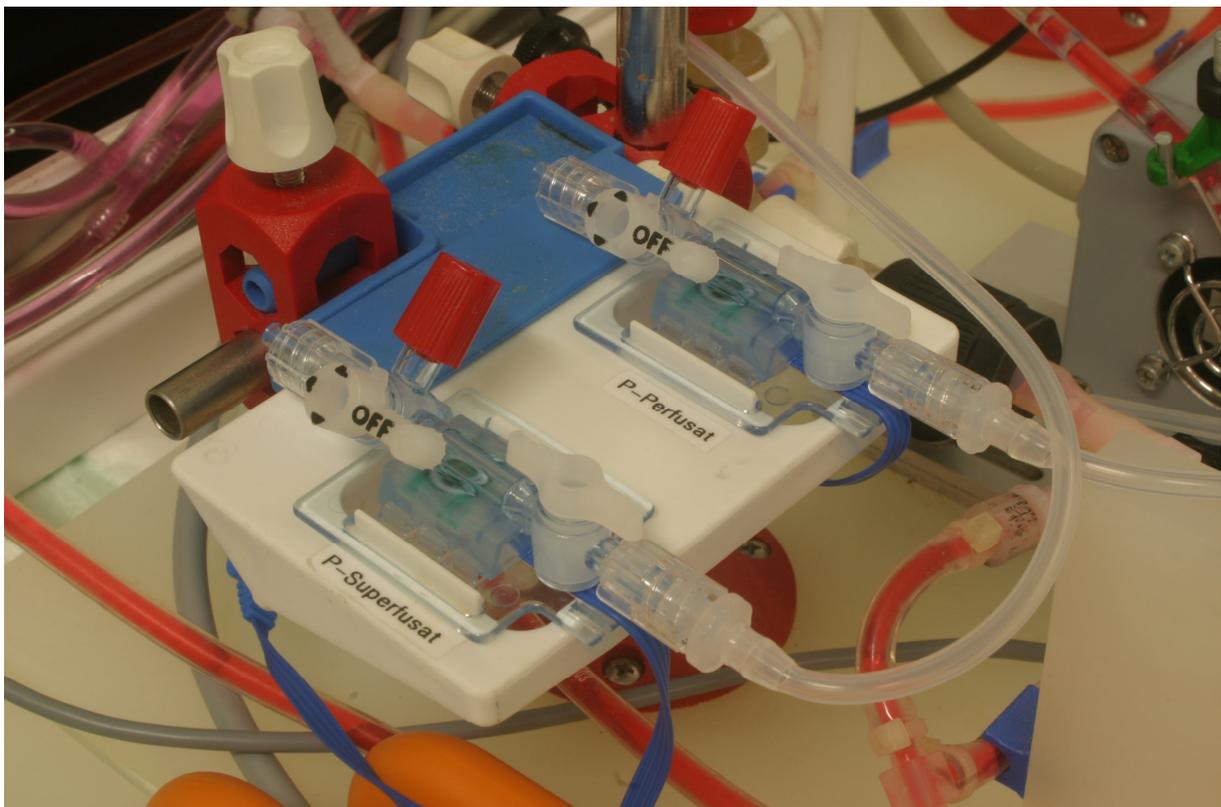


Abbildung 13 Drucksensoren der Per- und Superfusion eines Anlagenkreislaufs installiert auf der entsprechenden Montageplatte einer Aufnahmekonstruktion (siehe Abb. 5)

4.1.1.16 **Temperierungsanlage**

4.1.1.17 **Thermostaten**

Aus methodischen und Gründen der Positionierung werden zwei digital gesteuerte Umwälzthermostaten eingesetzt, welche mit entmineralisiertem Wasser gefüllt sind:

A.	Ein Thermostat (Ecoline, Lauda) temperiert die drei Kulturmediumreservoirs und Oxygenatoren, welche in relativer Nähe zueinander angeordnet sind. Von zwei Hauptsträngen (Zu-/Rücklauf) zweigen über T-Verteiler (FMI) mit selbst sperrenden CPC-Schnellkupplungen die entsprechenden Anschlüsse ab.
B.	Der zweite Thermostat (DC-10, Haake) versorgt die Wärmeaustauscher und Organzylinder der drei Anlagenkreisläufe. Die Warmwasseranschlüsse letzterer sind mit selbst sperrenden CPC-Schnellkupplungen über T-Verteiler (FMI) mit zwei Warmwasserhauptsträngen (Zu-/Rücklauf) verbunden.

Tabelle 5 Zur Anlagentemperierung verwendete Thermostaten und deren
Versorgungsbereiche

Für eine Temperatur von 37°C im Venenlumen, bei laufender Perfusion und Superfusion, ist es erforderlich, die Thermostaten auf 39,2°C, die Pumpenintensität von A (Tab. 4) auf Stufe 4 und die von B (Tab. 4) auf Stufe 2 einzustellen.

4.1.1.18 **Wärmetauscher 1-6**

Zur weiteren Temperierung des Perfusats und des Superfusats ist dem Organzylinder jeweils ein Wärmeaustauscher vorgeschaltet (Abb.14). Das Kulturmedium durchfließt dabei ein ca. 1,5 m langes, zur Spirale gewickeltes 6/4 Glasrohr, das in ein Glasrohr mit GL 14 Anschlüssen eingeschmolzen ist (FMI). Über diese GL 14 Verschraubungen mit eingesteckten Luer-Lock-Fittings erfolgt die Verbindung mit dem Schlauchteil der Anlage. Über zwei seitliche GL 14 Ansätze (Zu-/Rücklauf) des äußeren Glasrohrs mit Luer-Lock-Anschlüssen werden die Wärmeaustauscher in den entsprechenden Warmwasserkreislauf eingebunden. Ein nach innen ragender Silikonschlauch am Luer-Lock-Fitting des Warmwasserrücklaufs gewährleistet dabei die Entlüftung des Wärmetauschers in der geforderten Einbaulage. Die Wärmetauscher sind vollständig autoklavierbar.

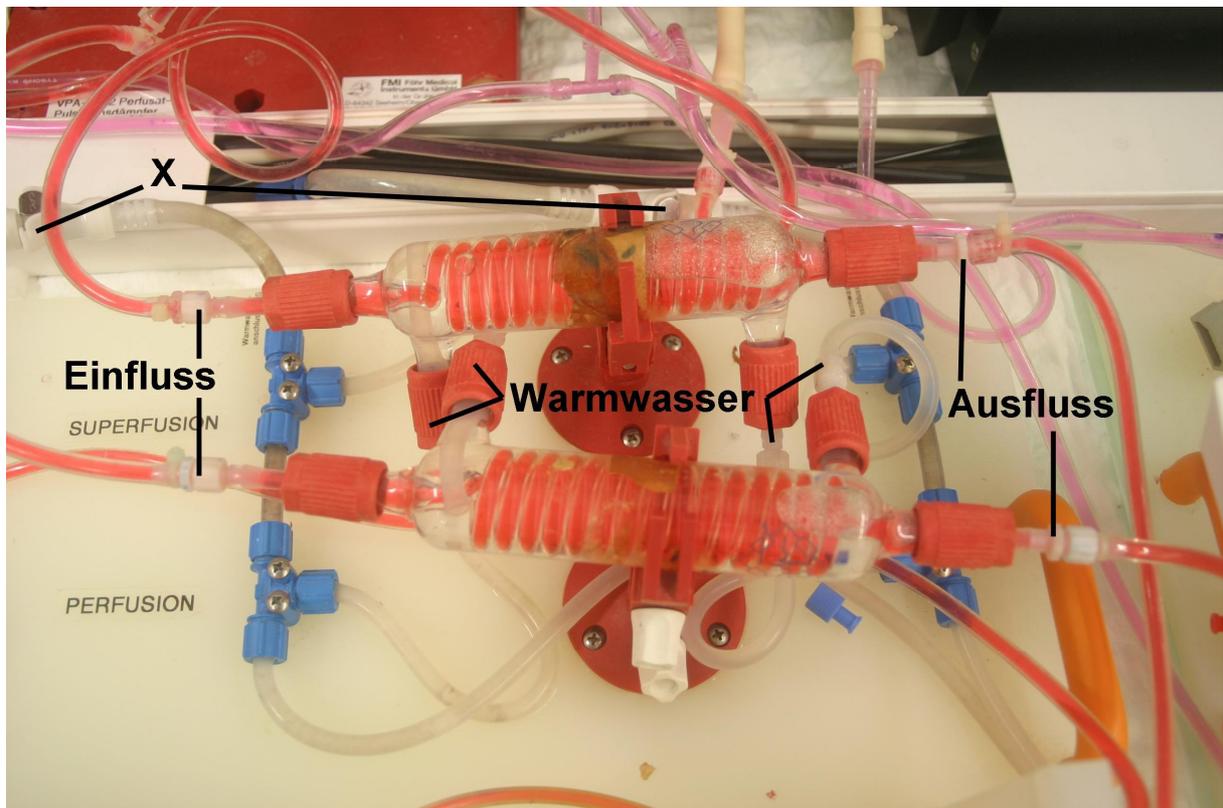


Abbildung 14 Wärmetauscher der Super- und Perfusion mit Anschlussbezeichnungen; X = Warmwasserversorgung eines Anlagenkreislaufes durch Verbindung mit den zu- und abführenden Warmwasserhauptsträngen über CPC-Schnellkupplungen

4.1.1.19 Warmwasserkreisläufe

Die durch zwei getrennte Systeme realisierten Kreisläufe sind als Hauptstränge für Zu- und Rücklauf gestaltet, von welchen über T-Stücke Abzweigungen zu den einzelnen Systemkomponenten geschaltet sind. Die Ankopplung an letztere erfolgt zum einen über CPC-Schnellkupplungen als auch zusätzlich über Luer-Lock-Verbindungen bei den Wärmeaustauschern und Organzylindern (siehe 4.1.1.10 bzw. 4.1.1.14). Um die Temperierung des Kulturmediums ausreichend zu sichern, wurden außerdem Teile der Hauptstränge als Begleitheizung zusammen mit Abschnitten der Perfusions- und Superfusionsschläuche in einem gemeinsamen Kabelkanal verlegt.

4.1.2 Betrieb der Anlage

Jeder der folgenden Punkte bezieht sich auf einen Anlagenkreislauf. Um alle drei Kreisläufe gleichzeitig zu betreiben, muss jeder Punkt entsprechend wiederholt werden.

4.1.2.1 Vorbereitung der Anlage

Aufgrund des komplexen Aufbaus der Anlage ist es nötig, jeden Kreislauf einzeln aus verschiedenen sterilisierten bzw. autoklavierten und zur Einmal-Verwendung bestimmten Teilen (Tab. 5) vor einer Inbetriebnahme zusammenzusetzen. Bei Versuchen, die sterile Verhältnisse erfordern, muss der gesamte Zusammenbau in einer Sterilbank vorgenommen werden. Das Zusammensetzen sollte in diesem Falle so schnell wie möglich geschehen, um die Wahrscheinlichkeit des Eindringens von Keimen so niedrig wie möglich zu halten. Hierfür ist es sinnvoll, sich die Einzelteile in der Sterilbank bereitzulegen.

Anlagenkomponente	Sterilisation
Schlauchteil eines Anlagenkreislaufs	Autoclav*
1 Kulturmediumreservoir	Autoclav*
1 Oxygenator	Ethylenoxid
Adapter-, Entlüftungsschlauchstücke des Oxygenators (Einfluss, Ausfluss, Gasanschluss), hydrophober Filter (0,2µm)	Autoclav*
2 Dämpferspritzen	Einweg (steril)
Wärmetauscher für Perfusion und Superfusion	Autoclav*
Starling-Widerstand	Autoclav*
Druckabnehmer für Perfusion und Superfusion	Ethylenoxid
2 Luer-Lock-Verschlüsse (Combi-Stopper, Braun)	Einweg (steril)
Schnellanschlüsse für die Warmwasserversorgung des Vorratsbehälters und des Oxygenators (2mal Einlauf / 2mal Auslauf)	-
4 Schlauchklemmen	-
Klebeband	-

Tabelle 6 Zur Vorbereitung eines Anlagenkreislaufs benötigte Komponenten und deren Sterilisationsart (* entspricht Dampf, 121 °C, 1 Bar Überdruck)

Um Unklarheiten zu vermeiden, folgen die jetzt beschriebenen Arbeitsschritte nacheinander den einzelnen Stationen, die das Kulturmedium später vom Vorratsbehälter aus durchfließt (Vgl. Abb. 8).

Der Oxygenator muss für den Betrieb entsprechend Tabelle 7 mit den entsprechenden Schlauchstücken versehen werden (siehe auch Abb. 7).

1.	Schnellverschlüsse des Warmwasserkreislaufs an den Wärmetauscherzylinder
2.	Unsteriles Gasanschlussschlauchstück an den Begasungszylinder
3.	Entlüftungsschlauchstück mit hydrophobem Filter an den oberen Anschluss des Begasungszylinders
4.	Adapterschlauchstücke am Zu- und Abfluss des Oxygenators

Tabelle 7 Vorbereitung eines Oxygenators vor Integration in einen Anlagenkreislauf

Der Einfluss des Schlauchteils kann nun mit dem Ausfluss des Oxygenators verbunden werden.

Das gewünschte Dämpfervolumen wird mit den Dämpferspritzen aufgezogen, der Spritzenstempel mit Klebeband fixiert und die Spritze an den entsprechenden Anschlüssen der Superfusion und der Perfusion angeschlossen (T-Stücke, die auf die Pumpenschläuche folgen).

An die im Verlauf auf die T-Stücke folgenden Luer-Lock-Anschlüsse der Per- und Superfusion werden die beiden Wärmetauscher angeschlossen.

Der anschließende Schlauchteil mit wiederum zwei Luer-Lock-Anschlüssen wird für die spätere Installation des Besiedelungszylinders zugänglich gehalten.

An die im letzten Abschnitt des Kreislaufs befindliche schwarz markierte Luer-Lock-Verbindung wird der Starling-Widerstand angeschlossen.

In diesem Bereich des Schlauchteils befinden sich auch die beiden Schlauchenden, an die die beiden Druckabnehmer angeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass der Schlauch für den Superfusions-Druckabnehmer nicht mit dem Abfluss-Schlauch verwechselt wird. Letzterer schließt an den Starling-Widerstand an. Ein- und Ausfluss werden mit Luer-Lock-Verschlüssen versehen, wenn der Anlagenkreislauf steril gehalten werden soll.

Nachdem in einer abschließenden Kontrolle ein mögliches unbeabsichtigtes Eindringen von Keimen durch nach außen unverschlossene Anlagenteile ausgeschlossen wurde, wird nun der soweit zusammengesetzte Anlagenkreislauf zu seiner entsprechenden Aufnahmevorrichtung gebracht. Der Übersichtlichkeit wegen sollte die Installation der einzelnen Komponenten, in ihren Halterungen und ihre

Verbindung mit entsprechenden Warmwasser- u. Sauerstoffanschlüssen, an der Einflusseite, also mit dem Oxygenator, beginnen u. dann entsprechend der Flussrichtung fortgeführt werden. Dies beinhaltet auch das Einlegen der Pumpenschläuche in den entsprechenden Pumpenkopf für Per- u. Superfusion nach Installation des Oxygenators. Um später einen schnellen und unproblematischen Einbau des Besiedelungszyinders zu gewährleisten, werden die entsprechenden Luer-Lock-Anschlüsse leicht zugänglich gehalten, außerdem Schlauchklemmen vor und nach diesen Verbindungen angebracht. Letzteres verhindert unkontrolliertes Eindringen unsteriler Luft beim Öffnen der Anschlüsse für Integration des Organzylinders.

4.1.2.2 Inbetriebnahme

4.1.2.2.1 Befüllung mit Kulturmedium

Für die Befüllung der Kulturmediumbehälter wird deren Ausfluss zunächst mit einer Schlauchklemme verschlossen. Ihre Befüllung erfolgt dann je nach Anforderung an die Sterilität, zum Beispiel unter einer Sterilbank und durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm; z.B. Express Plus, Millipore) mit mindestens 300 ml Medium, um später die vollständige Füllung der Anlage gewährleisten zu können.

Zur Befüllung der Anlage wird der Kulturmediumbehälter an seinem vorgesehenen Platz mit den entsprechenden Warmwasseranschlüssen, sein Ausfluss mit dem Einfluss des Oxygenators und sein Einfluss mit dem Ausfluss des Schlauchteils der Anlage über die entsprechenden Luer-Lock-Anschlüsse verbunden. Um eine Kontamination zu vermeiden sollten die letzten beiden Vorgänge entsprechend schnell vonstatten gehen.

Als letzter Schritt wird die Schlauchklemme am Ausfluss des Vorratsbehälters geöffnet.

4.1.2.2.2 Versuchsbereite Anlage

Vor Versuchsstart mit einem entsprechend 4.1.2.1 und 4.1.2.2.1 vorbereiteten Kreislauf sollten die Wärmekreisläufe der Anlage auf Temperatur gebracht, die Vorratsbehälter der Thermostaten ausreichend gefüllt sowie weitere Flüssigkeit bereitgestellt werden, um die Warmwasserbefüllung der Kulturmediumvorratsbehälter zu ermöglichen. Noch vor Einbau von Gefäßmaterial in den Besiedelungszyinder sollte dann die komplette Anlage bis auf den Organzylinder in Betrieb genommen, das heißt die Pumpen gestartet u. ein gewünschtes Gasflussvolumen eingestellt werden, damit das Kulturmedium bei

Installation des Zylinders ausreichend begast und erwärmt ist sowie unter Umständen vorhandene Luftblasen aus dem Schlauchsystem entfernt werden können.

4.1.2.3 Einbau von Gefäßmaterial in den Organzylinder

Hierfür benötigt man in Tabelle 8 angegebene, für entsprechende Versuche sterile, Materialien.

Materialien	Sterilisation
Abdecktuch	Einweg (steril)
Handschuhe	Einweg (steril)
Zwei Pinzetten	Autoklav*
Schere	Autoklav*
Vorrichtung zum Gefäßeinbau (siehe 4.1.1.12)	Autoklav*
Set aus Besiedelungszylinder, Gefäßanschlussröhrchen (1mal kurz / 1mal lang) benötigten Außendurchmessers an der Gefäßaufnahmeseite (siehe 4.1.1.11) mit entsprechend T-Stücken, min. 2 Silikonfäden L =15 cm (eigentlich Silikonschlauch, Da = 0,5 mm, Di = 0,3 mm, Laboflex) jeweils ein Ende mit dickem Knoten	Auoklav*
Handelsüblicher Dreiwegehahn mit Luer-Lock-Anschlüssen	Einweg (steril)
hydrophiler Filter mit Luer-Lock-Anschluss (Minisart 25 mm/ Porengröße 0,2 µm, Sartorius Stedim)	Einweg (steril)
Petrischale befüllt mit gewünschtem (sterilem) Medium	Autoklav*

Tabelle 8 Für den Einbau von Gefäßmaterial in einen Anlagenkreislauf benötigte (sterile) Materialien (* entspricht Dampf, 121 °C, 1 Bar Überdruck)

Wenn der folgende Arbeitsschritt in kompletter Sterilität erfolgen soll, ist es notwendig, die benötigten Komponenten zunächst steril auf einer sterilen Unterlage (Abdecktuch) unter der Sterilbank abzulegen, den Deckel von der Petrischale zu entfernen und erst dann, ebenfalls unter der Sterilbank, die sterilen Handschuhe anzuziehen. Die Petrischale kann nun am keimfreien Oberrand in die entsprechende Aufnahme der Gefäßeinbauvorrichtung überführt werden. Mit den gefäßaufnehmenden Seiten über der Petrischale werden die Glasröhrchen in den dafür vorgesehenen Halterungen verspannt. Die folgenden Arbeitsschritte sollten

schnellstmöglich vonstatten gehen, wenn organisches Gewebe verwendet wird, um eine schädigende Austrocknung zu vermeiden.

Zur Gewährleistung größtmöglicher Sterilität wird das entsprechende Gefäßmaterial unter zu Hilfenahme der Pinzetten über die entsprechenden Glasröhrchenenden gezogen. Die Silikonfäden, mit dem einen Ende in ihrer Halterung auf der Gefäßeinbauvorrichtung fixiert, werden so lange in Höhe der Einkerbung des Glasröhrchens mit Hilfe der Pinzetten um das Gefäß gewickelt, bis dieses nicht mehr abrutschen kann, und verknotet. Die Silikonfäden sollen dabei für eine frei definierbare und gleichmäßig verteilte Kraft sorgen, mit der das Gefäßmaterial auf die Glasröhrchen gepresst wird. Sollte zum Beispiel bei einem venösen Gefäß aufgrund seiner Klappen die Flussrichtung bestimmt werden müssen, erfolgt dies im nächsten Schritt. Hierfür wird das Gefäß einfach mit Hilfe einer handelsüblichen Spritze über die Glasröhrchen in jeder Richtung perfundiert und so der Weg des geringsten Widerstandes bestimmt. Das so bestimmte Einflussglasröhrchen, ansonsten das kurze Glasröhrchen, wird nun an der den Superfusions- und Wärmeanschlüssen des Besiedelungszyinders abgewandten Seite zuerst in diesen eingeführt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich das Gefäß nicht verdreht. Da eine solche Verdrehung, die aufgrund eines Perfusatstaus möglicherweise zu einer Blähung des Gefäßes führt, auch in den weiteren Arbeitsschritten auftreten kann, sollte man sich die korrekte Stellung zum Beispiel anhand der Anordnung der Silikonfadenknoten merken. Über die Enden der Glasröhrchen werden nun Bola-Labor-Verschlüsse gefädelt und mit dem Besiedelungszyinder fest verschraubt. Das Gefäß sollte dabei leicht gespannt und nicht verdreht werden, die Enden der Glasröhrchen mindestens 4 cm aus dem Besiedelungszyinder ragen. An diese werden die beiden T-Stücke entsprechend Ein- und Ausfluss (der Ausfluss liegt konstruktionsbedingt immer an der Seite des Rotationsrades des Organzylinders) angeschlossen, wobei auch dabei darauf zu achten ist, dass Position und Spannung des Gefäßes nicht nachteilig verändert werden. Die abzweigenden Teile werden beide mit Dreiwegehähnen versehen, bei Versuchen, die sterile Verhältnisse erfordern, wird diesen jeweils ein hydrophiler Filter vorgeschaltet.

4.1.2.4 Einbau des Organzylinders in den Anlagenkreislauf

Hierfür werden zunächst beide Pumpen gestoppt, anschließend die Schlauchklemmen an den Luer-Lock-Verbindungen der Super- und Perfusion, an die der Organzylinder angeschlossen werden soll, geschlossen (siehe 4.1.2.1). Erwähnte Luer-Lock-Verbindungen werden nun geöffnet und mit den entsprechenden Anschlüssen des Organzylinders verbunden. Dieser Schritt sollte im

Fall von sterilen Versuchsverhältnissen schnellst möglich erfolgen, um durch die Öffnung des Kreislaufs letzteren nicht zu verunreinigen. Nach Öffnung der Schlauchklemmen werden die Pumpen wieder gestartet und der Organzylinder schließlich noch an die Warmwasserversorgung angeschlossen.

4.1.2.5 Austausch des Kulturmediums

Falls erforderlich wird der Mediumwechsel eines Kreislaufs wie folgt durchgeführt. Vorbereitend wird ein Kulturmediumbehälter entsprechend der Anleitung in Punkt 4.1.2.2.1 mit Medium befüllt. Zu Beginn des Wechsels werden die Pumpen gestoppt und der Einfluss des Schlauchteils sowie der Ausfluss des zu wechselnden Kulturmediumbehälters mit Schlauchklemmen geschlossen. Der Anlageneinfluss sollte anschließend ohne Verzögerung, um einer Verunreinigung entgegenzuwirken, mit dem Ausfluss des neuen Reservoirs verbunden und die Schlauchklemmen an beiden geöffnet werden. Nachdem die Pumpen gestartet und mit ca. 180 ml des neuen Mediums altes Nährmedium größtenteils in den alten Reservoirbehälter entfernt wurde, werden die Pumpen erneut gestoppt, der Ausfluss des Schlauchteils abgeklemmt und mit dem Einfluss des neuen Mediumbehälters, ebenfalls ohne Verzögerung, verbunden. Abschließend wird letztere Schlauchklemme wieder geöffnet und nach dem Starten der Pumpen das Reservoir an seinen Temperierungskreislauf angeschlossen.

4.1.2.6 Mediumprobenentnahme

Um ein Eindringen von Luft oder Keimen in den Anlagenkreislauf zu vermeiden, sollte bei Probenentnahmen folgendermaßen vorgegangen werden: Eine wie im Medizinbereich übliche Spritze gewünschten Volumens wird in den Drei-Wege-Hahn am T-Stück je nach Bedarf auf der Ein- oder/und Ausflusseite des Organzylinders eingesteckt. Nun werden beide Rollerpumpen abgeschaltet und der Abflussschlauch der Superfusion und der Perfusion unmittelbar nach dem Organzylinder abgeklemmt. Hierdurch wird verhindert, dass bei Öffnung des Dreiwegehahns durch abströmendes Medium Luft in die Anlage gesogen wird. Im Falle von Löchern im eingespannten Gefäß kann dies auch über den Superfusionsschlauch geschehen. Im Falle der Ausflusseite wird bei nun geöffnetem Dreiwegehahn die Mediumprobe direkt aus dem Organzylinder bzw. dem Gefäß gezogen. Nach Beendigung der Probenentnahme wird der Dreiwegehahn wieder verschlossen, die Schlauchklemmen werden geöffnet und die Rollerpumpen wieder gestartet.

4.2 Untersuchungen zu unterschiedlichen Anlagen-Milieus

In diesen Untersuchungen wurden Rindervenen unter unterschiedlichen Bedingungen im Bioreaktor inkubiert. Mit Hilfe spezifischer Funktionstests der Venen vor und nach, sowie Mediumprobenanalysen während der jeweiligen Inkubation wurden Eigenschaften verschiedener Anlagenmilieus sowie ihre Auswirkung auf Nährstoff-, Sauerstoffverbrauch und bestimmte Funktionen der Gefäße bestimmt.

4.2.1 Versuchsablauf

Die Rindervenen wurden vier unterschiedlichen physiologischen Milieus (Gruppe 1, 1', 2 und 3) ausgesetzt (Tab. 8).

Gruppe	1	1'	2	3
N	16	8	5	8
Dextran	Nein	Nein	Ja	Ja
Intraluminaler Druck	Nein	Nein	Nein	Ja
Dauer	4 Tage	8 Tage	4 Tage	4 Tage

Tabelle 9 Eigenschaften der unterschiedlichen untersuchten Versuchsmilieus (Gruppe 1, 1', 2 und 3) und Anzahl der dem jeweiligen Milieu ausgesetzten Rinderven

Ein Segment jeder Vene diente als Kontrolle und lieferte die Ausgangswerte der Organbadexperimente, MTS-Reduktion und Histologie, welche mit den Werten nach Inkubation verglichen wurden. Während der Inkubation wurden Nährmediumwechsel und –analysen durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurde auf die vollständige Sterilität des Systems geachtet, da bereits eine geringe Kontaminierung eine Auswirkung auf die verschiedenen Messparameter bedeuten konnte. Zusätzlich zu den angegebenen in allen Nährmedien vorhandenen Antibiotika wurde daher eine tägliche visuelle Prüfung auf eine Trübung des Mediums durchgeführt sowie eine Untersuchung auf Bakterien und Pilzwachstum von Mediumproben nach Abschluss des Versuchslaufs. Alle Experimente mit Hinweisen für Unsterilität wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt.

4.2.2 Bioreaktor-Einstellungen

Das Nährmedium wurde mit einer Mischung aus 20 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid mit einer Flussrate von 100 ml/min begast, die Temperatur auf $37 \pm 0,02$ °C temperiert. Der Superfusionsfluss wurde auf 20 ml/min, der Perfusionsfluss auf 40 ml/min (entsprechende Pulsfrequenz ca. 28/min, siehe 4.1.1.2) eingestellt. Rein rechnerisch (Superfusions- bzw. Perfusionsvolumen / jeweiliger Fluss) ergibt sich hier für einen kompletten Mediaustausch des jeweiligen Kompartments im Organzylinder eine Zeit von 2,6 min für die Superfusion und von 8 s für die Perfusion. Für Versuche bei denen zusätzlich ein intraluminale Druck auf die Rinderven wirken sollte, wurde im jeweiligen Anlagenkreislauf durch den Starling-Widerstand und über den Drucksensor der entsprechenden Perfusion ein gleicher, empirisch festgelegter intraluminale Druck von 20 mmHg zu Beginn eines Versuchslaufs eingestellt. Die Dämpferspritzen wurden in allen Gruppen für eine maximale Dämpfung mit einem Volumen von 50 ml gefüllt.

4.2.3 Medium

Die Basis bildete das Nährmedium „M199 with Earle's salts“ (PAA) ergänzt durch 20 % fetales Kälberserum (PAA), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml; Roche), Gentamicin (100 µg/ml; Roche) und eine Supplementierung für Endothelzellmedien (jeweilige Endkonzentration: FCS 0,02 ml/ml, ECGS/H 4,00 µl/ml, human rec. EGF 0,10 ng/ml, human rec. bFGF 1,00 ng/ml, Hydrokortison 1,00 ng/ml, Gentamicin 50,00 µg/ml, Amphotericin B 50,00 ng/ml; Provitro).

In Versuchsläufen mit Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht 40000; Sigma) wurde dieses für eine Konzentration von 12 % hinzugefügt, um so die Viskosität des Nährmediums auf die von Blut zu erhöhen (35). Hierdurch sollten die physiologischen Scherkräfte simuliert werden. Diese Scherkräfte ließen sich über die Poiseuille-Formel unter Annahme eines starren Gefäßdurchmessers abschätzen (36). Letzterer betrug im Schnitt 5 mm. Die außerdem notwendigen Viskositätswerte der verwendeten Kulturmedien wurden im Auftrag an der Hochschule München (Dr. Ing. S. Moravec, Hochschule für angewandte Wissenschaften FH München, Fachbereich 5 Versorgungstechnik, Lothstrasse 34, 80335 München) mittels eines Rotationsrheometers (Haake) bestimmt und beliefen sich für Medium auf 1,0 cP, für Medium mit Dextran auf 4,0 cP. Hieraus ergaben sich Scherkräfte von etwa $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ ohne und $2,2 \text{ dyn/cm}^2$ mit Dextran. Da in menschlichen Venen Scherkräfte zwischen 1 und 6 dyn/cm^2 herrschen (36), erreichten wir hier wie beabsichtigt einen physiologischen Bereich. Aufgrund von Beobachtungen aus

Vorversuchen erwies sich ein Austausch des Nährmediums vormittags alle zwei Tage nach Versuchsstart als sinnvoll, je nach Versuchslänge also an Tag 2, 4 und 6; er wurde nach der in Punkt 4.1.2.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Nährmediummenge betrug in allen Inkubationsmilieus 300 ml.

4.2.4 Gefäßmaterial: Rinderven

Die für die Versuche verwendeten Rinderven stammen von jungen Rindern, denen kurz nach ihrer Schlachtung brauchbare oberflächlich verlaufende Venensegmente als Pedikel, inklusive Arterien u. Fettgewebe, im Bereich der Innenseite der hinteren Oberschenkel entfernt wurden. Die Proben wurden in sterilem Krebs-Henseleit Puffer (KHB; NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 16,7 mM, Dextrose 5,5 mM, CaCl₂ 1,2mM), ergänzt durch HEPES (25 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100µg/ml), innerhalb von 30min bei 4°C in das Labor überführt. Zusammen mit einer möglichst schnellen Installation in den Anlagen-Kreislauf konnte erreicht werden, dass die Ischämiezeit drei Stunden nicht überschritt.

4.2.4.1 Präparation des Gefäßmaterials

Für den Einbau in den Organzylinder war eine Präparation der Rinderven mit Hilfe der in Tabelle 9 angegebenen Materialien notwendig.

Materialien	Sterilisation
Steriles Abdecktuch	Einweg (steril)
Sterile Pinzette	Autoclav*
Sterile Schere	Autoclav*
Sterile Infusionskanüle mit Spritze	Einweg (steril)
Gefäß mit 70 %igem Ethanol	-
Gefäß mit steriler PBS-Lösung	-
Petrischale mit steriler PBS-Lösung	Autoclav*

Tabelle 10 Für die Rindervenpräparation verwendete Materialien (* entspricht Dampf, 121 °C, 1 Bar Überdruck)

Um größtmögliche Sterilität zu gewährleisten, fand der gesamte Vorgang stets unter einer Sterilbank statt. Ebenfalls aus diesem Grund wurde das Präparationsmaterial zunächst in 70 %igem Ethanol für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden ca. 3 cm von jedem Ende auf einer sterilen Unterlage mit einer sterilen Schere abgetrennt,

der verbliebene Teil mit einer sterilen Pinzette in ein Gefäß mit sterilem PBS (phosphate buffered saline; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10,8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) überführt und dort gewaschen. Bei der nun folgenden Präparation aus dem umgebenden Bindegewebe wurde neben Gefäßmaterial für Kontrollversuche ein ca. 8 cm langes Gefäßstück gewonnen. Letzteres wurde in eine Petrischale mit steriler PBS-Lösung überführt und vor Verunreinigung mit einem entsprechenden Deckel geschützt. Anschließend wurde die so vorbereitete Vene entsprechend Punkt 4.1.2.3 in dem Organzylinder installiert.

4.2.5 Analytische Methoden

4.2.5.1 Organbad

Hier wurde die Reaktion des Gefäßmaterials auf kontrahierend und dilatierend wirkende Substanzen vor und nach Inkubation getestet. Diese Versuche wurden in einem IOA-5300 Organbad-System (FMI) durchgeführt. Hierfür wurde das zu überprüfende organische Gefäßmaterial vom umgebenden Bindegewebe befreit und in kurze Gefäßsegmente von ca. 3 mm Länge geschnitten. Diese Ringe wurden zwischen zwei Haken aus rostfreiem Stahl eingespannt, welche wiederum in 5 ml Organbädern aufgehängt wurden. Der obere Haken ist dabei mit einem isometrischen Kraftsensor verbunden. Die Kontraktionskraftdaten von allen acht Bädern wurden dann kontinuierlich mittels einer PC Daten Akquisitions-Software aufgezeichnet. Die einzelnen Organbäder wurden mit Krebs-Henseleit Lösung (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 16,7 mM, Dextrose 5,5 mM, CaCl₂ 1,2 mM) befüllt. Der pH wurde auf 7,4 bei 37°C eingestellt, indem die Bäder kontinuierlich 5 % CO₂ haltigem Gas ausgesetzt wurden. Der restliche Anteil des Gases bestand aus 95 % O₂ (insgesamt Carbogen-Gas).

Die Gefäß-Ringe bzw. -Streifen wurden zunächst durch eine mindestens 120 min dauernde Äquilibrationsphase, im Laufe derer man das Gefäßmaterial auch zweimal mittels 150 mM KCl kontrahieren lässt, auf eine initiale Kontraktionskraft von 20 mN eingestellt. Sämtliche vasoaktive Substanzen werden direkt in die Bäder pipetiert und durch Waschen der Bäder auf Knopfdruck nach Erreichen der jeweiligen maximalen Wirkung auch wieder unmittelbar beseitigt. Neben den erwähnten KCl-Kontraktionen wurde der Funktionszustand der Gefäße durch Konzentrations-Wirkungskurven auf bestimmte vasoaktive Substanzen, welche kumulativ immer nach Erreichen des maximalen Effekts der vorhergehenden Dosis zugegeben wurden, untersucht. So wurde die Kontraktion auf folgendermaßen

zunehmende Konzentrationen Noradrenalin (Aventis) untersucht: 0 M (=Kontrolle), $1 \cdot 10^{-11}$ M, $3 \cdot 10^{-11}$ M, $1 \cdot 10^{-10}$ M, $3 \cdot 10^{-10}$ M, ..., $1 \cdot 10^{-5}$ M.

Im Weiteren wurde die endothelabhängige Relaxation, wodurch eine weitere Aussage über den Funktionszustand des Endothels getroffen werden konnte, auf steigende Konzentrationen Acetylcholin (Alexis) gemessen. Hierfür wurden alle Gefäßringe mit Hilfe von Noradrenalin auf 80 % der vorherigen maximalen Noradrenalinwirkung kontrahiert und anschließend mit Dosen aufsteigend von $1 \cdot 10^{-11}$ M bis $1 \cdot 10^{-5}$ M, immer um eine Dezimalstelle, nach Erreichen der maximalen Wirkung der vorherigen Dosis, erhöht, stufenweise relaxiert. Indem einem Organbad kein Acetylcholin zugegeben wurde, diente der hier installierte Gefäßring als Kontrolle um so eine Reaktion auf Acetylcholin von einer gefäßeigenen zeitabhängigen Erschlaffung unterscheiden zu können. Am Ende des Versuchs wurde eine einzelne Dosis Natrium-Nitroprussid (500µM SNP; Alexis), welches durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid in der glatten Muskulatur wirkt, die endothelunabhängige Relaxation bestimmt.

4.2.5.2 MTS-Reduktion

Mit Hilfe dieses Tests wurde der Zellmetabolismus (37) vor und nach Inkubation untersucht. Hierfür wurden die Venensegmente longitudinal eröffnet und mit der luminalen Seite nach oben zwischen zwei rechteckigen Platten aus Acrylglas mit Hilfe zweier Schrauben eingespannt. Durch Löcher in der oberen der beiden Platten entstanden insgesamt fünf Kammern deren Boden das Gefäßlumen bildete (38). Hier konnte dann die Umwandlung des chromogenen Substrates 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) bestimmt werden. Das Ausmaß der Umwandlung ist hierbei zu der gemessenen Absorption also optischen Dichte (OD) und damit der metabolischen Zellaktivität direkt proportional.

1.	Befreiung des zu testenden Gefäßmaterials von umgebenden Bindegewebe
2.	Longitudinale Eröffnung, Aufklappen und Waschen (z.B. in PBS) des Gefäßes
3.	Einspannen des Gefäßes in die MTS-Reduktions Vorrichtung mit der luminalen also Endothelseite nach oben
4.	Befüllen von zu testenden Kammern + 1 Kontrolle mit 20µl MTS-Reagenz (Fa. Promega, Madison, WI, USA)
5.	Befüllen von zu testenden Kammern + 1 Kontrolle mit 100µl M199 ohne FKS
6.	Inkubation für 60 min bei 37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O ₂ , 75 % N ₂ , 100 %

	Luftfeuchtigkeit (Brutschrankbedingungen)
7.	Durchmischung des Kammerinhaltes
8.	Überführung von 100µl des Kammerinhaltes auf eine frische 96-Well Platte
9.	Messung der Absorption bei 490 nm gegen 650 nm

Tabelle 11 Durchführung des MTS-Reduktions Tests

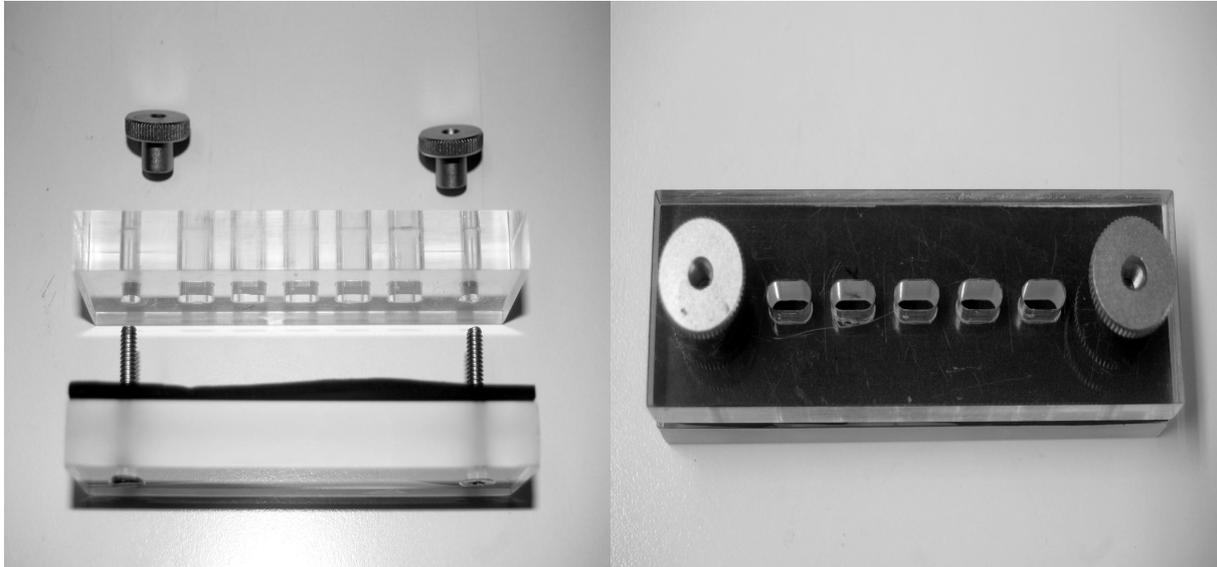


Abbildung 15 Vorrichtung für die MTS-Reduktion der luminalen Oberfläche von Gefäßsegmenten

4.2.5.3 Histologie

Für eine histologische Untersuchung der Auswirkungen wurden den Rinderven vor und nach der jeweiligen Inkubation kurze Segmente entnommen, diese in phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (4 %) fixiert, in Paraffin eingebettet, mit Hilfe eines Mikrotoms in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht.

Mit Hilfe der Hämatoxylin/Eosin-Mehrfachfärbung (HE-Färbung), welche die Zellkerne durch Hämatoxylin und die plasmatischen Bestandteile durch Eosin darstellt, konnte die Wandbeschaffenheit der Gefäßproben mikroskopisch beurteilt werden.

Die Färbung wurde entsprechend der allgemein bekannten Methodik wie in Tabelle 12 vorgenommen.

1.	Entparafinieren in Xylol (zweimal) für 5 min
2.	Absteigende Alkoholreihe (pro Alkoholkonzentration 2 min): 100 % Alkohol I, 100 % Alkohol II, 96 % Alkohol I, 96 % Alkohol II, 70 % Alkohol, 50 % Alkohol

3.	Aqua dest.
4.	7-10 min färben in Hämalaun nach Mayer
5.	10 min fließend wässern unter Leitungswasser
6.	Aqua dest.
7.	Beginn aufsteigende Alkoholreihe (pro Alkoholkonzentration 2 min): 50 % Alkohol, 70 % Alkohol, 96 % Alkohol
11.	2-3 min färben in Eosin 1 % alkoholisch
12.	96 % Alkohol; kurz spülen, bis keine Farbwolken mehr abgehen
13.	100 % Alkohol für 4 min
14.	Terpineol – Xylol
15.	Xylol 10 min
17.	Eindecken mit Entellan (Merck)

Tabelle 12 Hämatoxylin/Eosin-Mehrfachfärbung (HE-Färbung)

Bestehende Apoptosevorgänge wurden mit der TUNEL-Färbung sichtbar gemacht. Im Rahmen des „TdT-mediated dUTP nick end-labeling“ werden die bei der Apoptose durch Endonukleasenspaltung an DNA-Strängen freigesetzten Hydroxylgruppen durch das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) mit markierten Nukleotiden versehen. Letztere können dann mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Wir verwendeten hierfür den TUNEL-Assay der Firma Millipore.

4.2.5.4 Mediumprobenanalyse

Mittels eines Blutgasanalysegerätes (ABL 700; Radiometer) wurden Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, pH sowie Laktat-, Kalzium-, Natrium-, Kalium-, D-Glukose- und Chloridkonzentration an unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Tab. 12).

Tag 0	Probenentnahme und Analyse unmittelbar nach Versuchsstart, also Einbau des Gefäßmaterials und Inbetriebnahme der Anlage
Tag 1	Um die Mittagszeit
Tag 2	Vor Durchführung des Mediumwechsels, i.d.R. vormittags
Tag 3	Um die Mittagszeit
Tag 4	Unmittelbar vor Versuchende, i.d.R. vormittags

Tabelle 13 Zeitpunkte der Nährmediumprobenentnahmen an Zufluss und Ausfluss des Organzylinders während der Rinderveneneinkubation

Die Probenmenge betrug ca. 0,5 ml und wurde entsprechend Punkt 4.1.2.6 mit einer handelsüblichen 2 ml Spritze aus dem Medizinbedarf dem Anlagenkreislauf im laufenden Betrieb am blinden Enden des T-Stücks der Perfusion direkt vor und nach dem Organzylinder entnommen. Um eventuelle Messfehler durch Gasverlust aus der Probenspritze zu vermeiden, wurde diese anschließend sofort mit einem Stöpsel (Combi-Stopper; Braun) verschlossen, zum Blutgasanalysegerät überführt und die Probe sofort analysiert. Auf der Einflusseite des Organzylinders wurde der Sauerstoffpartialdruck, auf der der Ausflusseite Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck (Einheit: mmHg), die Konzentration der Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid (Einheit: mmol/l) sowie die D-Glukose- und Laktatkonzentration (Einheit: mg/dl) des Perfusionsflusses gemessen. Es wurde anschließend die Differenz der Sauerstoffpartialdrücke von Organzylindereinlass- und Organzylinderauslassseite berechnet, von welcher angenommen wurde zu dem Sauerstoffverbrauch des Rindervengewebes proportional zu sein.

Um den Umsatz von D-Glukose und Laktat zu vergleichen und so die Hypothese einer Milchsäuregärung zu testen, wurde aus den Werten der D-Glukose- und Laktatkonzentrationen der Dextroseverbrauch und die Laktatbildung in absoluten Werten (M) entsprechend der Änderung der Werte zu Tag Null berechnet. Um den Vergleich weiter zu erleichtern, wurden anschließend kumulative Kurven aus den täglichen Änderungen berechnet, indem diese unter Berücksichtigung der Mediumwechsel aufaddiert, die Laktatwerte unter der Annahme eines stöchiometrischen Ertrags von 2 mol Laktat pro mol D-Glukose mit 0,5 und die Änderung der D-Glukose mit -1 multipliziert wurden. Aus diesen kumulativen Werten wurden außerdem mit Hilfe linearer Regression D-Glukose-Verbrauch und Laktatproduktion pro Tag berechnet.

Um die Änderungen der verschiedenen Elektrolyte innerhalb einer Gruppe vergleichbar zu machen, wurden die relativen Elektrolytkonzentrationen berechnet, wobei der Wert an Tag 0 als 100 % dargestellt wurde. Des Weiteren wurden diese relativen Elektrolytkonzentrationen um die Mediumwechsel korrigiert, indem der Konzentrationsunterschied nach Mediumwechsel zur Ausgangskonzentration (100 %) bestimmt wurde und dieser zur letzten Konzentration vor Mediumwechsel addiert wurde. Hieraus ergaben sich kumulative relative Elektrolytkonzentrationen, aus denen sich mittels linearer Regression die prozentuale Konzentrationsänderung pro Tag berechnen ließ. In der grafischen Darstellung wurden die Fehlerbalken zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet, diese entsprechen den Standardabweichungen in den Grafiken der absoluten Elektrolytkonzentrationen.

4.2.5.5 Verwendete Reagenzien

Sofern nicht angegeben wurden diese von Sigma oder Merck erworben.

4.2.5.6 Datenanalyse

Für die grafische Darstellung und statistische Auswertung wurden Mittelwerte \pm Standardabweichung verwendet. n entspricht der Zahl der Rinder, denen Venen entnommen wurden. Vier bis acht Ringe aus den jeweiligen Venenproben fanden für die Organbadexperimente Verwendung, drei bis fünf Wells der Vorrichtung für die MTS-Reduktion. Der dekadische Logarithmus der mittleren effektiven Konzentrationen $[\log(\text{EC}_{50})]$ wurde aus der Regression auf die Funktion für sigmoidale Dosis-Wirkungskurven $(y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - x) \text{Hillslope}}})$ errechnet (SigmaPlot 8.0; SPSS). Der statistische Vergleich von einfachen vor und nach Perfusion bestimmten Messwerten einer Gruppe geschah durch einen gepaarten T-Test, von einzelnen Messwerten verschiedener Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA), von Dosis-Wirkungs-Kurven durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (two-way RM ANOVA) und von Mediumprobenanalysewerte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA), gefolgt von einem HOLM-Sidak Test (SigmaStat 3.10; Systat Software). Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Generelle Erkenntnisse für den Anlagenbetrieb

An dieser Stelle sollen einige prinzipielle Feststellungen aus der Etablierung der Methodik über den Betrieb der Anlage dokumentiert werden, welche zum Teil aus Vorversuchen gewonnen wurden. So stellte es sich als sinnvoll heraus, den initial aus Silikon bestehenden Schlauchteil der Anlage durch Schlauchmaterial aus Tygon® zu ersetzen, da die Silikonschläuche in dem zuvor verwendeten Ausmaß einen zu großen Gasverlust zu verantworten hatten. Physiologische pCO₂-Werte ließen sich nicht halten, was auch überhöhte pH-Werte zur Folge hatte. Auch zeigten sich die Oxygenatoren zusammen mit dem verringerten Gasverlust so wirkungsvoll, dass sich bereits mit geringem Gasfluss und der Verwendung von Gasen mit 20 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxidgehalt physiologische Gaspartialdrücke und pH-Werte im Rahmen der Rindervenensversuche mit dem verwendeten Medium (siehe 4.2.3) erstellen und für mindestens 8 Tage halten ließen (siehe 5.2.3.1 und 5.2.3.2). In dem zu Beginn bestehenden Anlagenaufbau waren innerhalb der Superfusion und der Perfusion Sterilfilter integriert, auf welche jedoch nach wiederholtem Verstopfen und daraus resultierender Flussunterbrechung bereits nach ein bis zwei Tagen Mediumfluss verzichtet werden musste. Unter anderem bei hohen Drücken als Folge einer Flussunterbrechung, aber auch gegenüber der mechanischen Belastung der Schlauchteile im Rahmen von Auf- und Abbau zur Sterilisation, erwiesen sich im Gegensatz zu den Luer-Lock-Verbindungen die lediglich gesteckten Verbindungen zwischen Schläuchen und festen Bestandteilen der Kreisläufe als nicht ausreichend zuverlässig, weshalb sie mit Kabelbindern zusätzlich gesichert wurden. Die Installation der Kreislaufkomponenten in den Schlauchteil der Anlage konnte durch eine unterschiedliche farbige Markierung der entsprechenden Luer-Lock-Verbindungen (siehe 4.1.1.8) erheblich vereinfacht werden. Dies erwies sich nicht zuletzt vorteilhaft für einen raschen Zusammenbau unter sterilen Verhältnissen. Letzterer konnte durch eine sinnvolle gemeinsame Verpackung und Sterilisation von bestimmten Komponenten zusätzlich optimiert werden. Aufgrund der Lichtdurchlässigkeit aller Komponenten der Anlagenkreisläufe außer den Pumpenschläuchen und unklaren Auswirkungen von einfallender Sonnenstrahlung sowie Raumlicht auf Kulturmedium und im Kreislauf befindlichem Gefäßmaterial wurden entsprechende Anlagenteile während eines Versuches immer lichtundurchlässig abgedeckt. Versuche mit unterschiedlichen Dämperspritzenvolumina ergaben eine bereits ausreichende Abdämpfung der durch

die Pumpen hervorgerufenen Druckspitzen und –tiefen mit 50 ml Volumen. Bei genauer Einhaltung der Vorgaben für einen sterilen Anlagenbetrieb und einer entsprechenden Routine in der Durchführung erwies sich die entwickelte Methodik inklusive Mediumwechsel (siehe 4.1.2 ff.) sowohl im Rahmen von Vorversuchen als auch bei den Versuchen mit Rindervenen als zuverlässig ein steriles Anlagenmilieu für mindestens acht Tage aufrecht zu erhalten. Im Zuge der Rindervenensversuche konnte außerdem gezeigt werden, dass eine durch die Methodik des Starling-Widerstands (siehe 4.1.1.14) erzeugte Nachlast auch über mehrere Tage zuverlässig gehalten werden kann (siehe 5.2.1).

Mit einem Gummischlauchstück als Gefäßpräparatersatz und Wasser als Kulturmedium ließen sich versuchsweise, nach Anpassung der Einstellung von Pumpenflussraten, Dämpferspritzenvolumen und Starling-Widerstand, annähernd physiologische Pulscurven und Drücke erstellen (Abb. 16). Der Perfusionsfluss betrug hier 180 ml/min mit einer entsprechenden Pulsationsfrequenz von 126/min (siehe 4.1.1.2), der Superfusionsfluss 60 ml/min und das Volumen der Dämpferspritzen 50 ml. Der Druckgenerator des Starling-Widerstandes wurde auf 400 mmHg eingestellt.

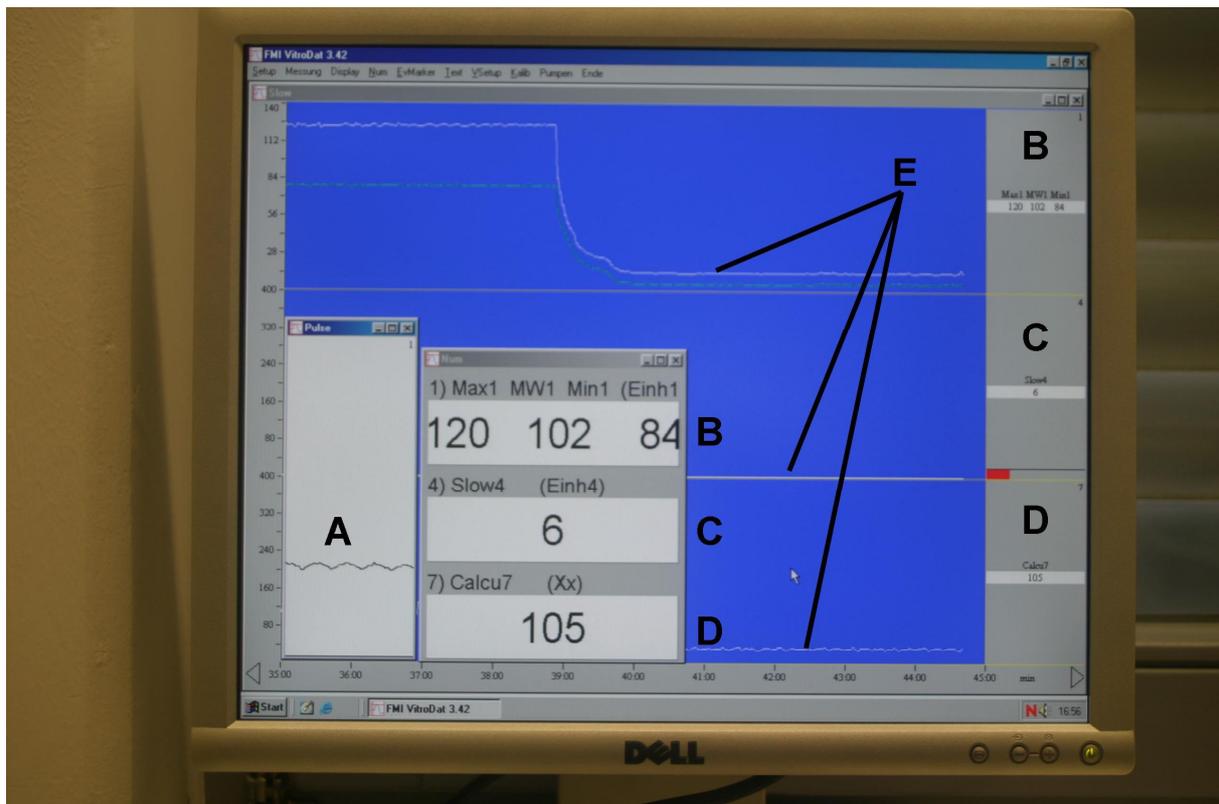


Abbildung 16 Dokumentation von physiologischen arteriellen Druckverhältnissen innerhalb eines Anlagenkreislaufes **A** Pulskurve **B** Systole/Mitteldruck/Diastole der Perfusion **C** Superfusionsdruck (nur gemittelt) **D** Druckdifferenz Perfusion – Superfusion **E** Verlauf der jeweiligen Messwerte über die Zeit

5.2 Versuche zum physiologischen Milieu

5.2.1 Luminaler Druck in Gruppe 3

Der in dieser Gruppe erhöhte Starling-Widerstand für einen empirisch festgelegten intraluminalen Druck von initial 20 mmHg betrug im weiteren Versuchsverlauf $20,0 \pm 5,4$ mmHg ($2,7 \pm 0,7$ kPa).

5.2.2 Auswirkungen der unterschiedlichen physiologischen Milieus auf die Kontraktilität, (endothelabhängige) Relaxation und MTS-Reduktion der Rinderven

5.2.2.1 Maximale Gefäßkontraktion nach Gabe von 150 mM Kaliumchlorid

In Gruppe 1 lag nach KCl-Gabe eine Kontraktion von $35,91 \pm 19,83$ mN als Ausgangswert vor Versuchsbeginn vor. Nach vier Tagen fiel die Kontraktionskraft auf $32,15 \pm 17,35$ mN (Abb. 17). Statistisch war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ($p = 0,572$).

Die mittlere reaktive Kontraktionskraft nach KCl-Gabe stieg in Gruppe 2 von $24,62 \pm 17,06$ mN bei Versuchbeginn auf $35,37 \pm 15,64$ mN nach vier Tagen Inkubation (Abb. 17). Dieser Anstieg war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,556$).

Von $33,01 \pm 22,41$ mN an Tag Null stieg die Kontraktionskraft in Gruppe 3 auf $45,12 \pm 17,50$ mN an Tag vier an (Abb. 17). In der statistischen Auswertung erschien kein signifikanter Unterschied ($p = 0,332$).

In Gruppe 1' lag die Ausgangskontraktion im Mittel bei $43,82 \pm 8,41$ mN, die Kontraktionskraft nach acht Tagen nur noch bei $21,56 \pm 11,39$ mN (Abb. 17). Die Statistik wies hier einen signifikanten Unterschied der Kraft zu den verschiedenen Zeitpunkten auf ($p=0,002$).

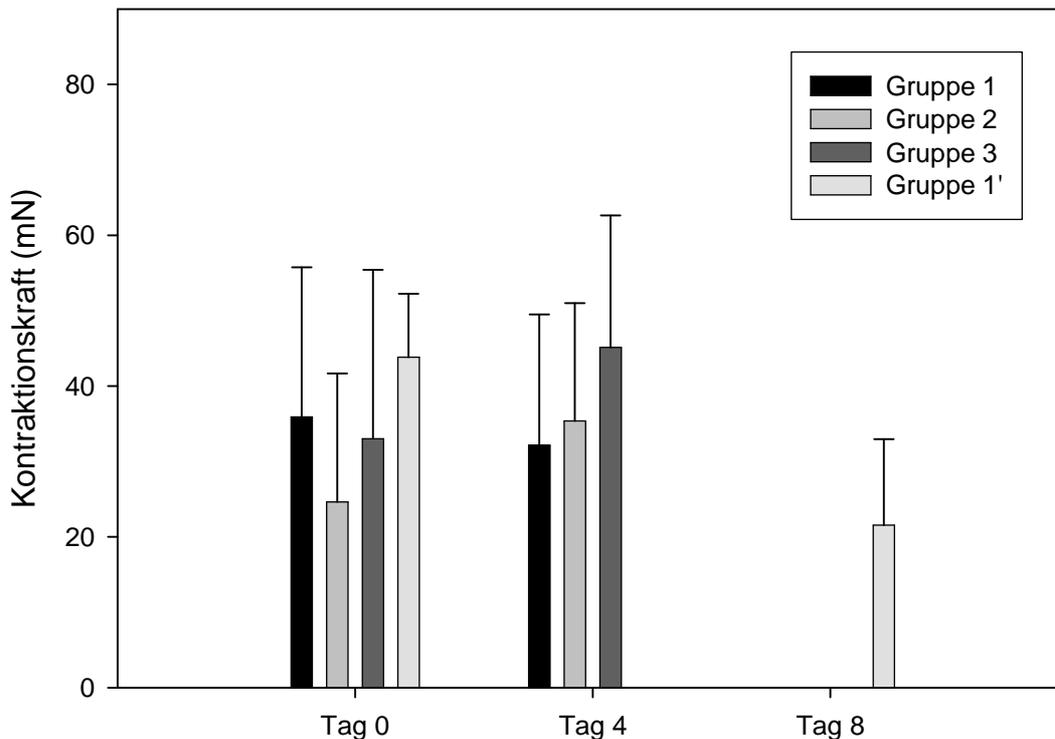


Abbildung 17 maximale Gefäßkontraktion von Rindervenien induziert durch 150 mM KCl vor und nach Inkubation im Anlagenkreislauf unter den Bedingungen der jeweiligen Gruppe

5.2.2.2 Dosis-Wirkungskurven der Noradrenalininduzierten Kontraktion

Wie sich auch Abbildung 18 entnehmen lässt, ließen sich die Gefäße der Gruppe 1 hier vor und nach Inkubation maximal auf $94,21 \pm 46,20$ mN kontrahieren. Die Kontraktionskurven verlaufen annähernd gleich. Lediglich im Bereich der Noradrenalin-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M zeigte sich nach vier Tagen ein leicht verzögerter Kontraktionsanstieg. Statistisch bestand zwischen den beiden Kurven kein signifikanter Unterschied ($p=0,655$). Während die Werte von Gruppe 2 (Abb. 19) an Tag Null auf maximal $54,72 \pm 34,36$ mN anstiegen, erreichten sie an Tag Vier $86,62 \pm 39,15$ mN, mit einem hier steileren Kontraktionsanstieg nach Erreichen der Noradrenalin-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7,5}$ M. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p=0,370$). Die maximalen absoluten Werte stiegen in Gruppe 3 von $96,63 \pm 56,10$ mN auf $123,92 \pm 41,84$ mN nach vier Tagen, mit einem steileren Kurvenverlauf ab $1 \cdot 10^{-8}$ M an Tag vier (Abb. 20) und ohne Signifikanz in den Unterschieden der Kurvenverläufe ($p=0,283$). In Gruppe 1' kontrahierten die Gefäße auf Werte um maximal $104,20 \pm 24,26$ mN an Tag Null und an Tag Vier mit einem flacheren Kurvenverlauf auf maximal $58,19 \pm 29,77$ mN (Abb. 21). Statistisch lag die Kontraktionskurve an Tag Acht signifikant niedriger im Vergleich zu Tag Null, und zwar ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M ($p=0,006$).

Gruppe 1

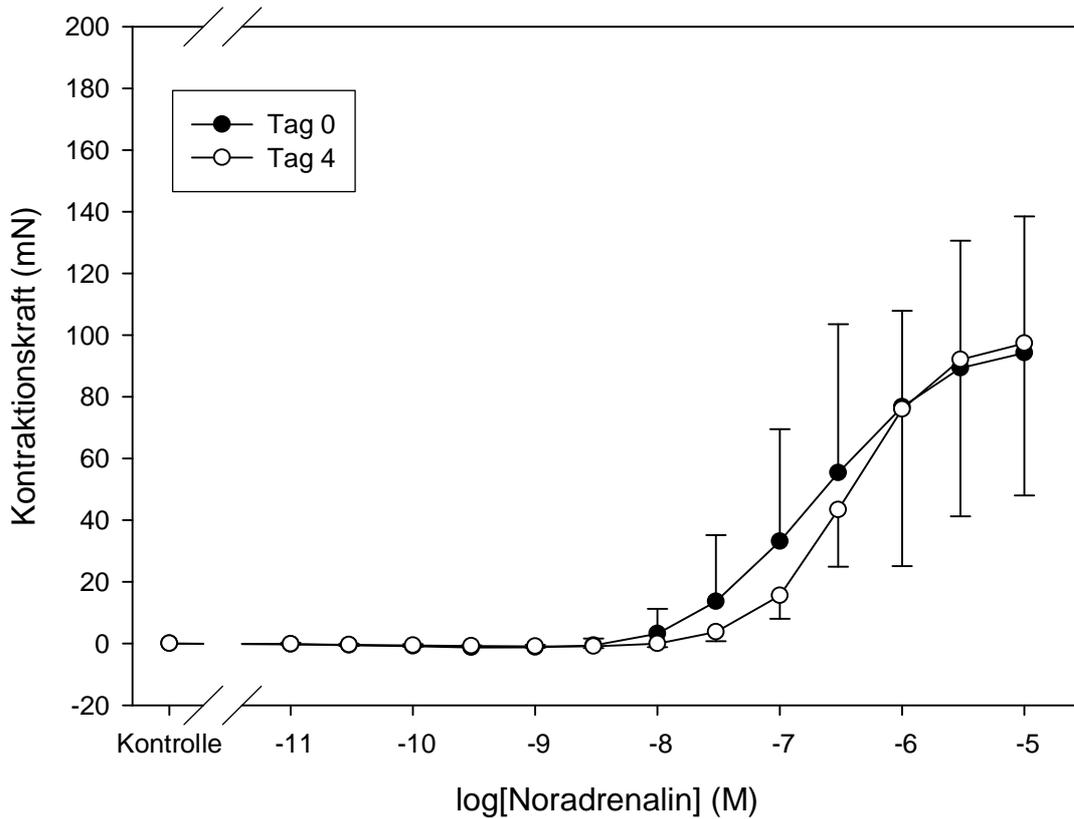


Abbildung 18 Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenien vor (schwarze Punkte) und nach (weiße Punkte) Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 1 im Anlagenkreislauf

Gruppe 2

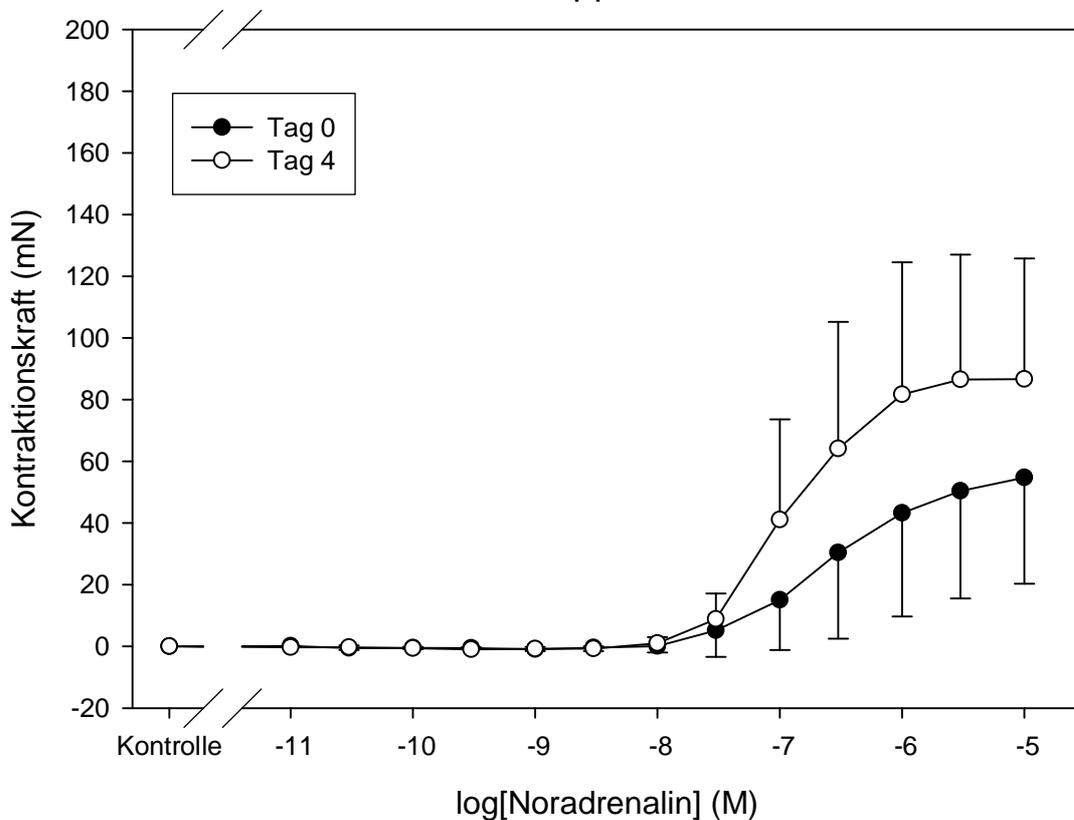


Abbildung 19 Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenien vor (schwarze Punkte) und nach (weiße Punkte) Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 2 im Anlagenkreislauf

Gruppe 3

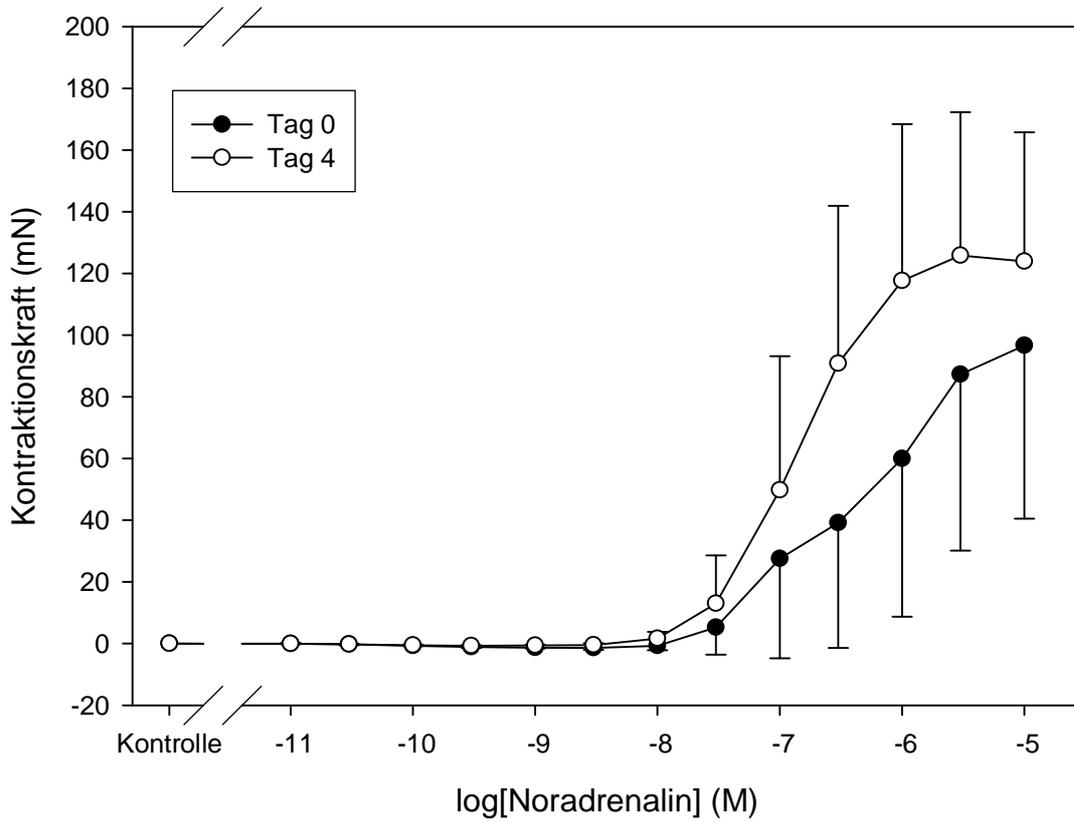


Abbildung 20 Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenien vor (schwarze Punkte) und nach (weiße Punkte) Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 3 im Anlagenkreislauf

Gruppe 1'

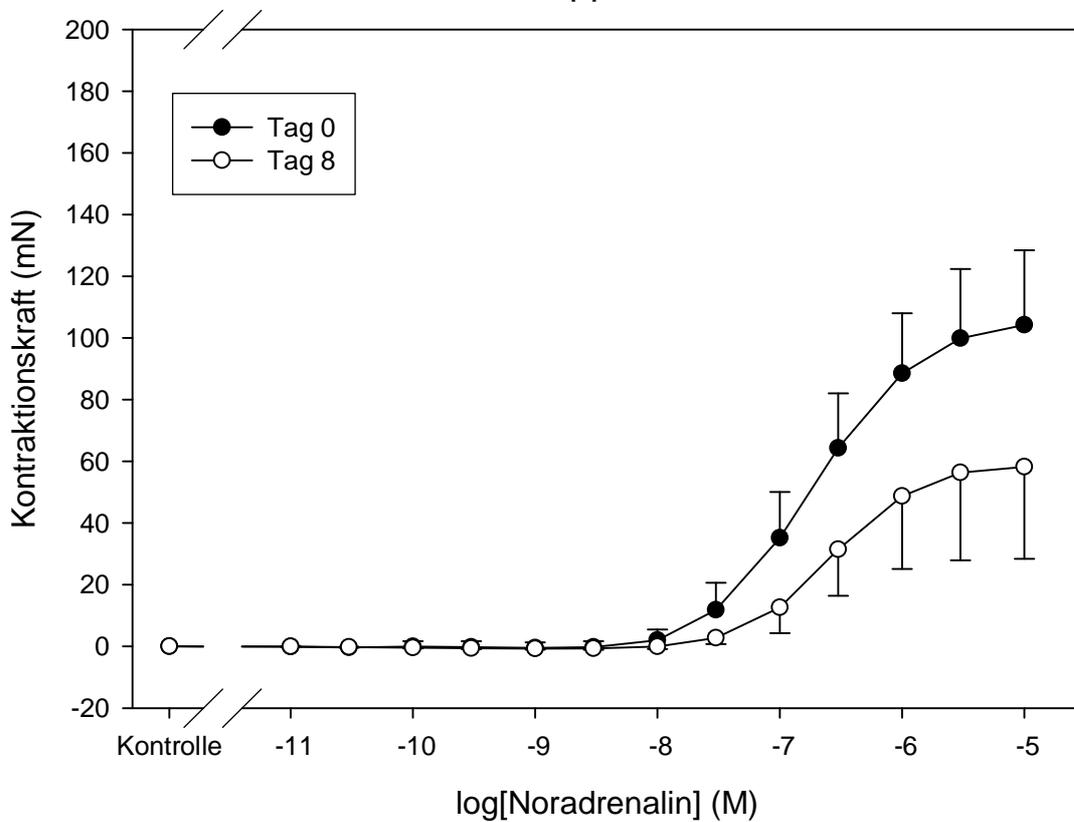


Abbildung 21 Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenien vor (schwarze Punkte) und nach (weiße Punkte) Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 1' im Anlagenkreislauf

Die Gabe von Noradrenalin hatte immer eine signifikante Änderung der Kontraktionskraft zur Folge ($p < 0,001$). Die Kontraktionskurven aller Gruppen wiesen an Tag Null einen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,001$) zwischen den Gruppen 2 und 1' sowie 1 und 2. Dieser Unterschied blieb auch nach Inkubation signifikant bestehen ($p < 0,001$), hier zwischen allen Gruppen außer 1 und 2. Tabelle 14 zeigt den dekadischen Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration [$\log(EC_{50})$] von Noradrenalin, also der Konzentration, die eine halbmaximale Kontraktion bewirkt.

Gruppe	1	2	3	1'
Kontrolle	-6,45±0,59	-6,40±0,62	-6,31±0,42	-6,70±0,28
Nach Inkubation	-6,36±0,16	-6,77±0,32	-6,67±0,32	-6,57±0,23

Tabelle 14 Noradrenalin $\log(EC_{50})$ Werte der Rindervenvenen vor und nach Inkubation unter den Bedingungen der jeweiligen Gruppe

Die statistische Auswertung ergab für alle Gruppen keinerlei signifikante Auswirkung durch die Inkubation auf die EC_{50} ($p_1 = 0,558$; $p_2 = 0,315$; $p_3 = 0,087$; $p_{1'} = 0,180$).

5.2.2.3 (endothelabhängige) Gefäßrelaxation

Vor Inkubation (Abb. 22 - 25) zeigten hier die Gefäße aller Gruppen eine Relaxation bis $1 \cdot 10^{-6}$ M, ab $1 \cdot 10^{-5}$ M eine Kontraktion und somit einen typischen Dosis-Wirkungskurvenverlauf für Acetylcholin (38).

Nach Inkubation (Abb. 26 - 29) wiesen die Kurven unabhängig von den Versuchsbedingungen nicht mehr den für Acetylcholin typischen Verlauf auf und unterschieden sich praktisch nicht mehr von der Kontrolle.

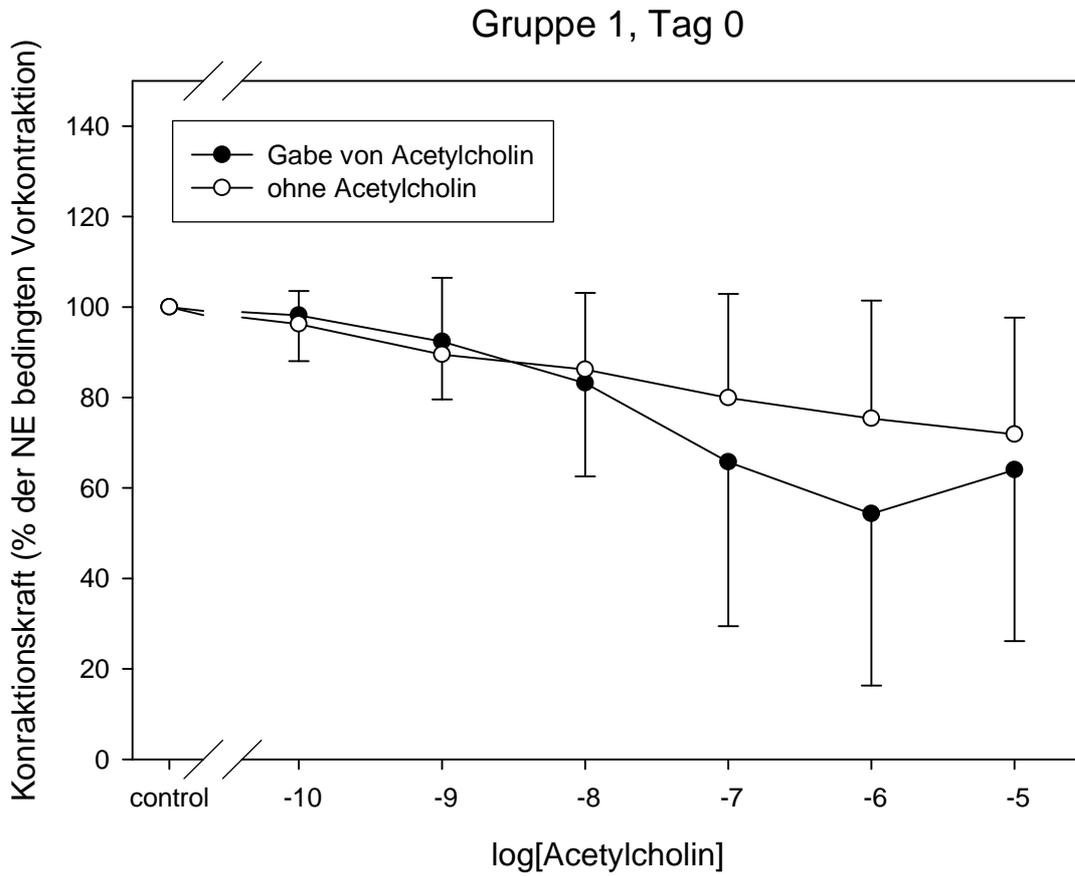


Abbildung 22 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 1, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

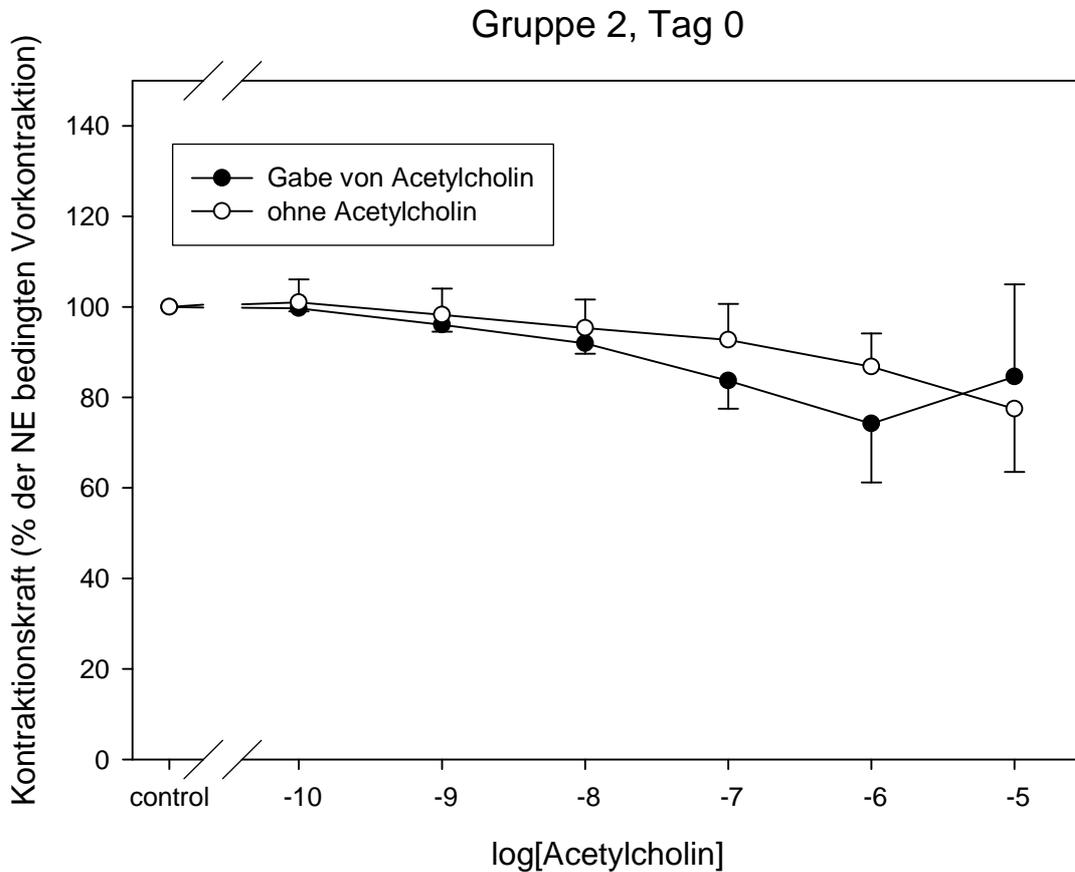


Abbildung 23 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 2, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

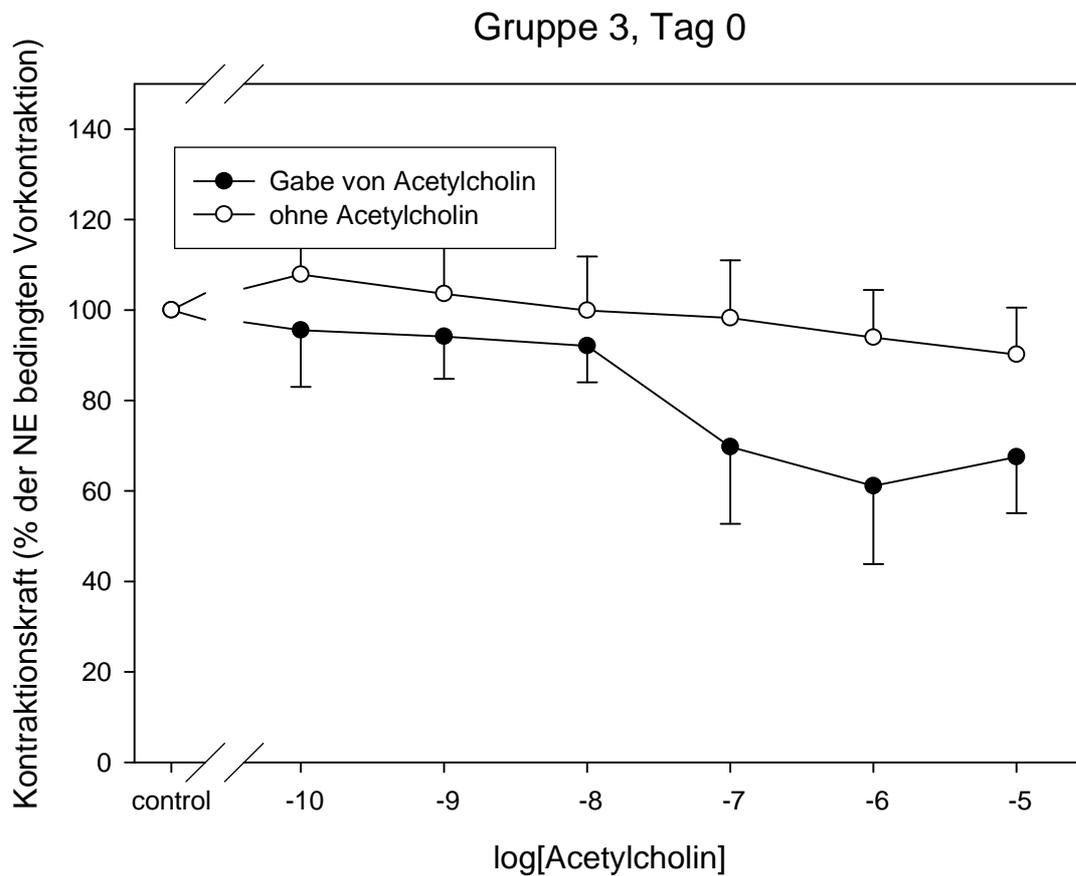


Abbildung 24 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 3, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

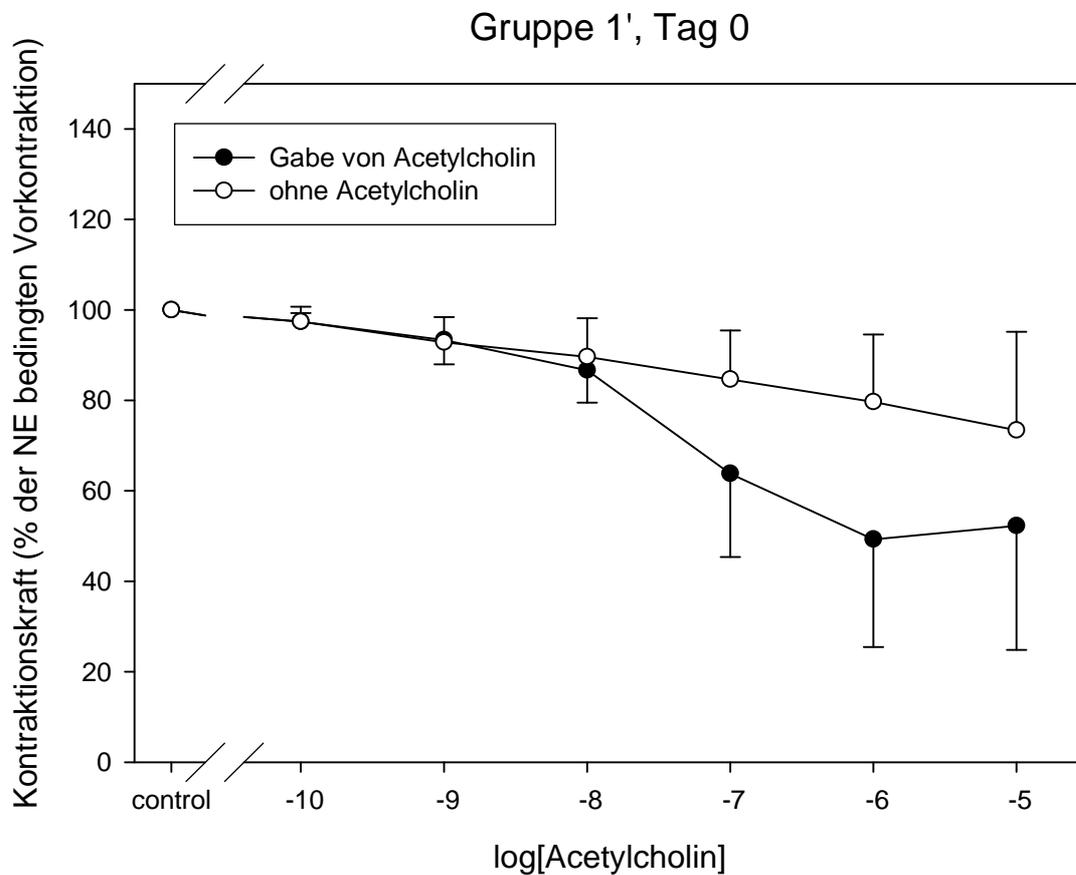


Abbildung 25 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 1', vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

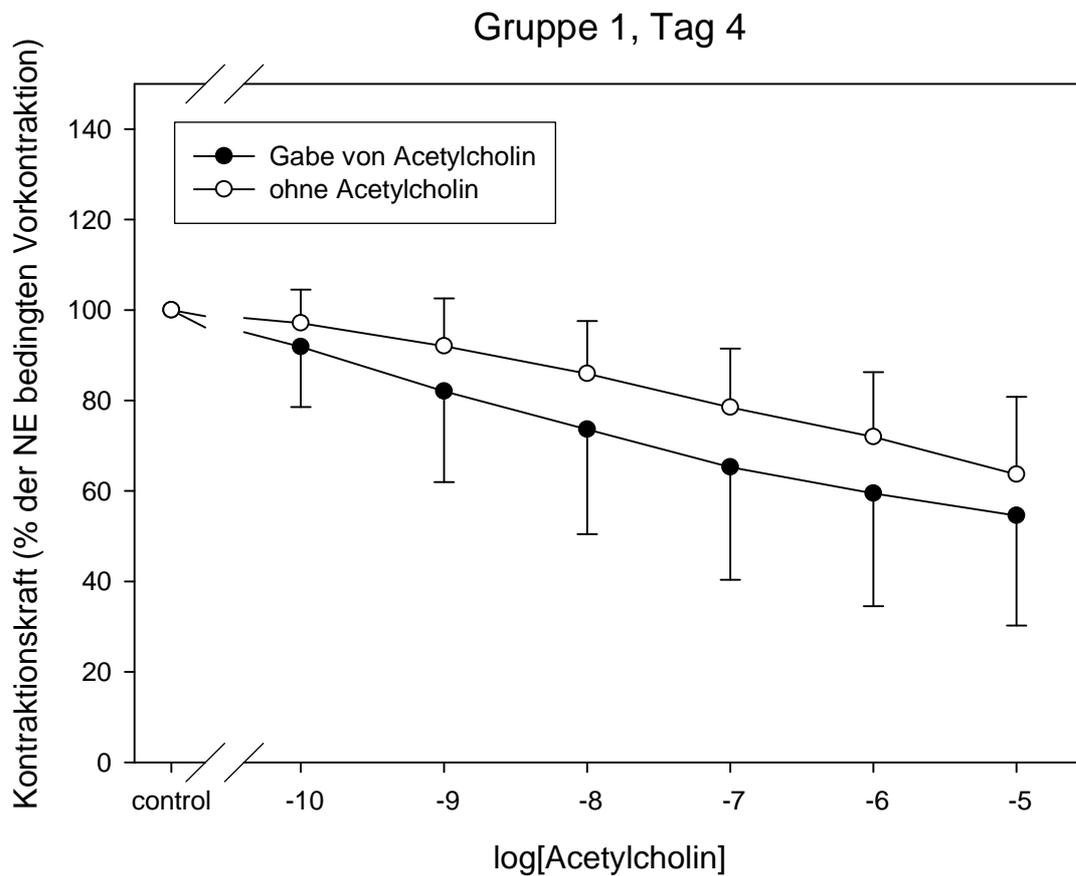


Abbildung 26 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 1, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

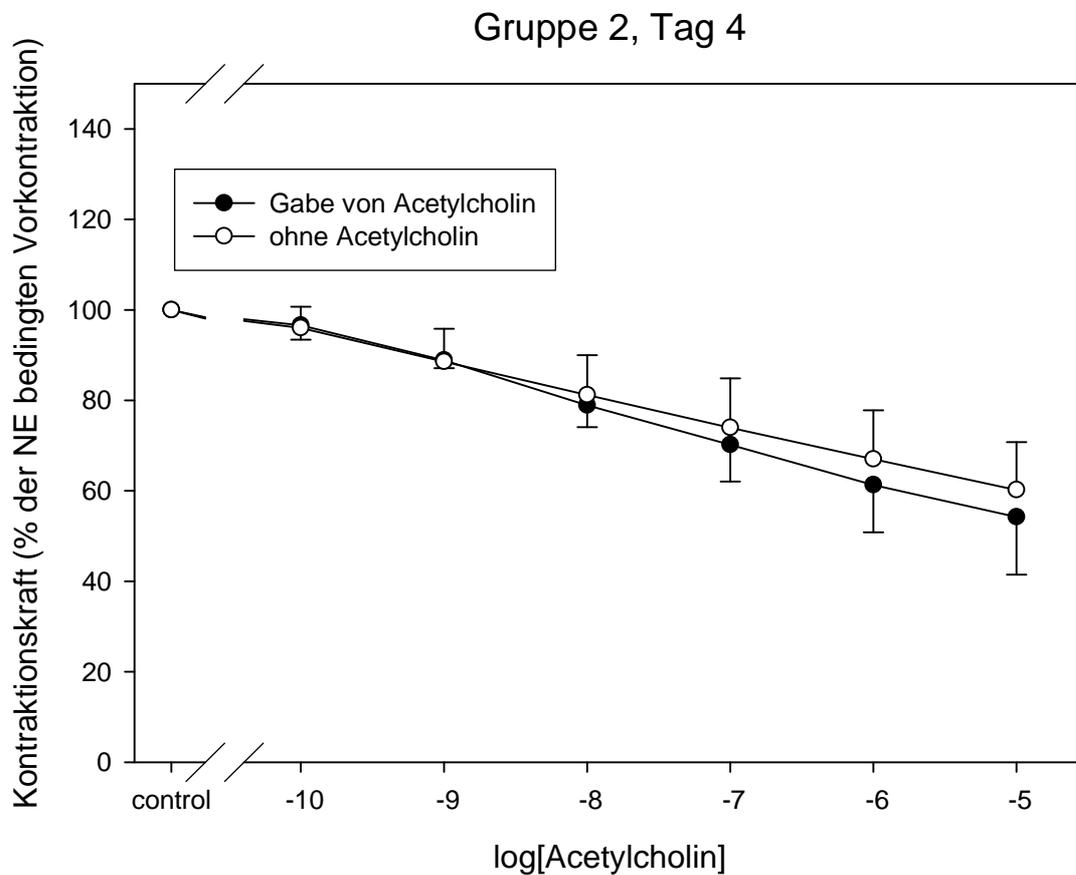


Abbildung 27 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 2, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

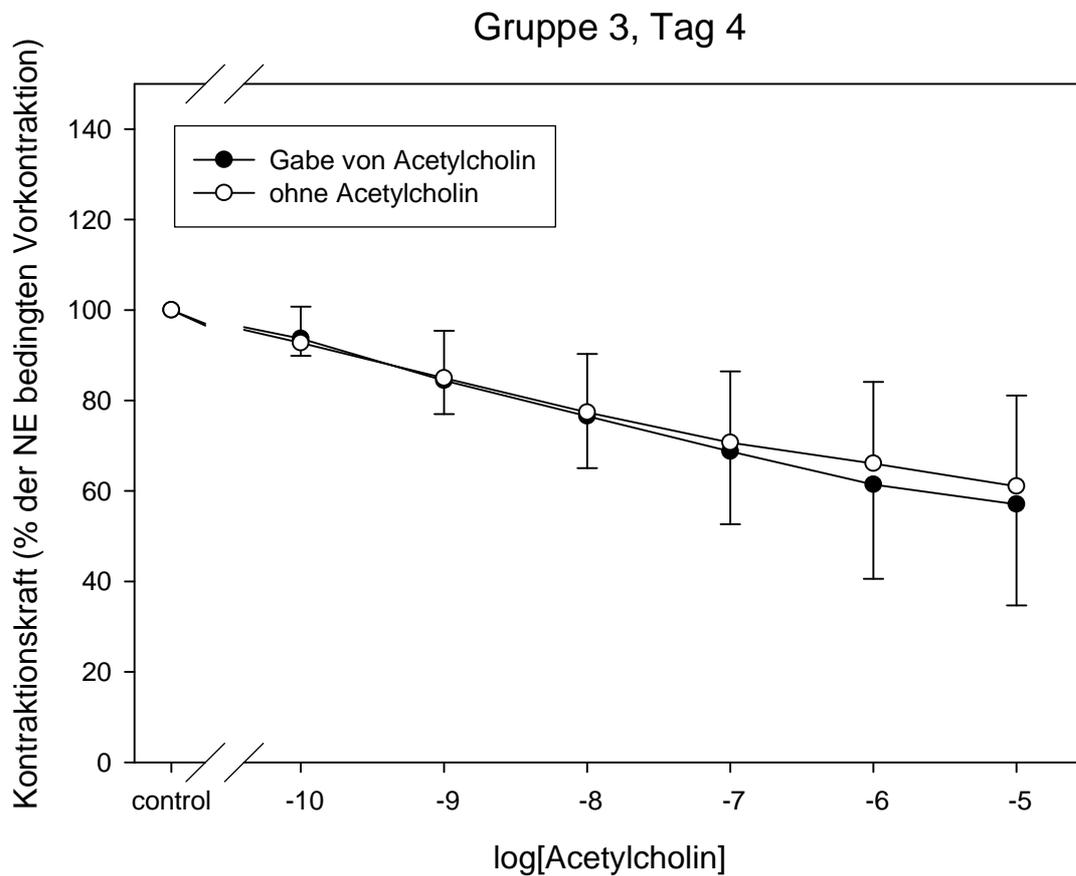


Abbildung 28 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 3, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

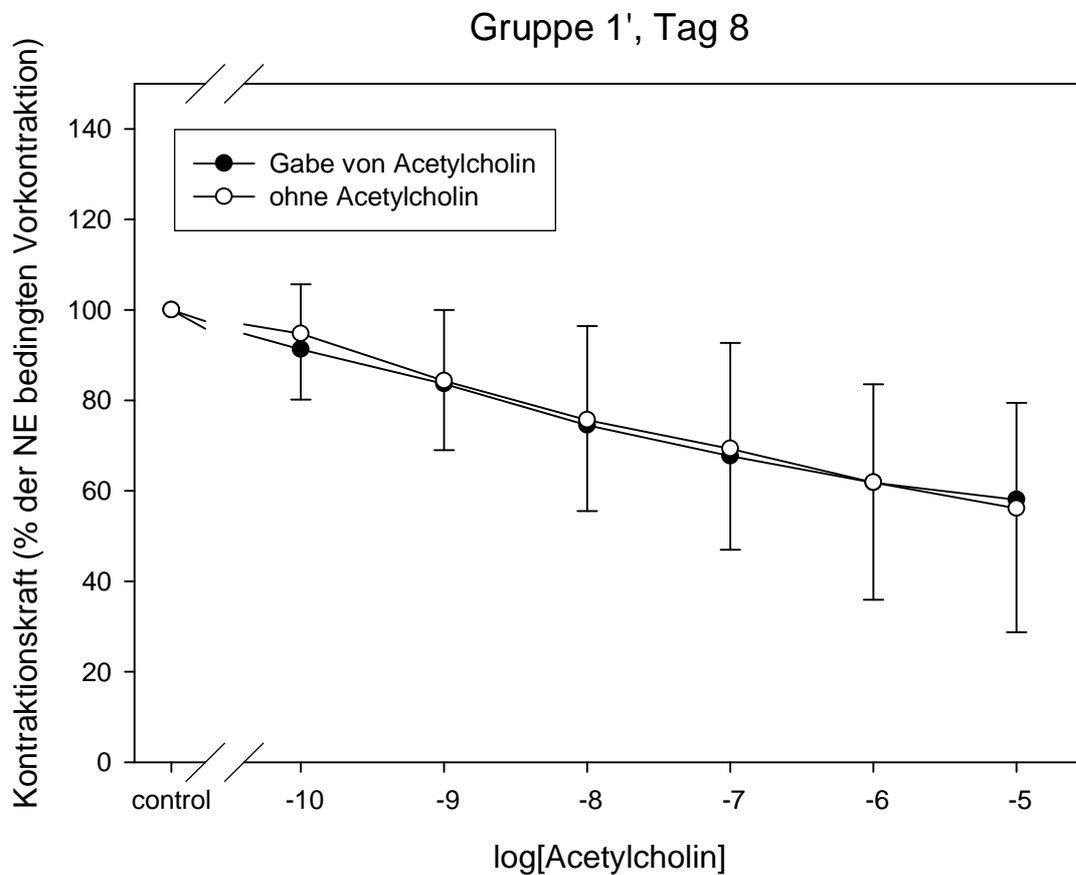


Abbildung 29 Verhalten der Rindervenekenkontraktionskraft (Gruppe 1', nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin

Unabhängig von der Gruppe und der Inkubationsart konnte bei allen Gefäßen durch die SNP-Gabe eine fast komplette Relaxation hervorgerufen werden. Abbildung 30 bildet zusammenfassend und repräsentativ für alle übrigen Gruppen die Reaktion von Rindervenvenen der Gruppe 1 auf steigende Konzentrationen Acetylcholin und anschließende SNP-Gabe vor und nach Inkubation ab.

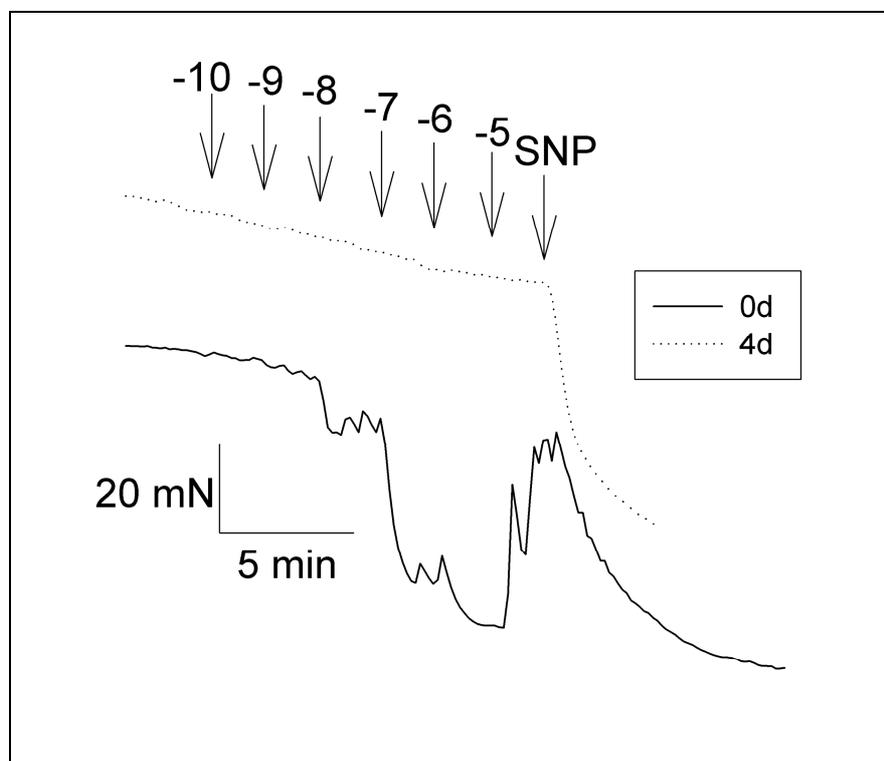


Abbildung 30 Reaktion von durch NE auf 80 % der maximalen Kraft kontrahierten Rindervenvenen der Gruppe 1 auf steigende Konzentrationen Acetylcholin (Angabe als Logarithmus) und anschließende SNP-Gabe

5.2.2.4 MTS-Reduktion

Die Ergebnisse der MTS-Reduktion vor und nach Inkubation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Gruppe	1	2	3	1'
Vor Inkubation	0,80±0,25	0,73±0,25	0,97±0,20	0,75±0,33
Nach Inkubation	0,99±0,22	1,09±0,14	0,98±0,21	0,88±0,18

Tabelle 15 OD_{430} der MTS-Reduktion durch die luminale Oberfläche der Rindervenvenen der jeweiligen Gruppe vor und nach Inkubation

Die statistische Auswertung ergab in keiner der Gruppen eine signifikante Auswirkung durch die jeweilige Inkubationsart ($p_1=0,068$; $p_2=0,333$; $p_3=0,946$; $p_{1'}=0,277$).

5.2.3 Nährmediumprobenanalysen

Da sich das Versuchs-Milieu von Gruppe 1 und 1' an den Tagen 1 bis 4 nicht unterschied, wurden diese Werte für eine übersichtliche grafische Darstellung zusammengefasst (= Gruppe 1+1').

5.2.3.1 Gaspartialdrücke

Die auf der Perfusionseinflussseite des Organzylinders gemessenen Sauerstoffpartialdruckwerte lagen bei 147 ± 2 mmHg und waren unabhängig von Inkubationsdauer und -bedingungen.

Wie sich auch der Grafik (Abb. 31) entnehmen lässt lag der Sauerstoffpartialdruck an der Perfusionsausflussseite zwischen 129 ± 14 mmHg (Tag 4, Gruppe 2) und 150 ± 4 mmHg (Tag 2, Gruppe 1+1'). Dabei verlaufen um ca. 5 mmHg nach unten verschoben in etwa parallel zu den übrigen Kurven die Werte von Gruppe 2. Die statistische Auswertung fand einen signifikanten Unterschied zwischen den Inkubationsarten ($p < 0,001$), hauptsächlich Gruppe 2 gegenüber den übrigen Gruppen. Innerhalb der Gruppe 1' bestand statistisch ein Unterschied zwischen Tag 3 und 7 sowie Tag 3 und 8 ($p = 0,003$), in Gruppe 1 zwischen Tag 1 und 4 ($p < 0,001$). Die übrigen physiologischen Milieus wiesen über die Zeit keine signifikante Änderung des Sauerstoffpartialdrucks im Nachtest auf.

Der Kohlendioxidpartialdruck lag unabhängig von der Inkubationsart im Bereich von 30 mmHg (Abb. 32). Der statistische Vergleich wies hier weder zwischen den verschiedenen physiologischen Milieus ($p = 0,556$) noch an unterschiedlichen Tagen innerhalb einer Gruppe einen Unterschied auf (Gruppe 1,2,3 $p = 0,081$ bzw. 1+1' über 8 Tage $p = 0,545$).

Der Sauerstoffpartialdruckgradient zwischen Organzylindereinlass und -auslass des Perfusionsflusses (Abb. 33) bewegte sich in einem Bereich zwischen maximal 18 ± 11 mmHg (Gruppe 2, Tag 4) und minimal -2 ± 4 mmHg (Gruppe 1+1'). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen ($p < 0,001$).

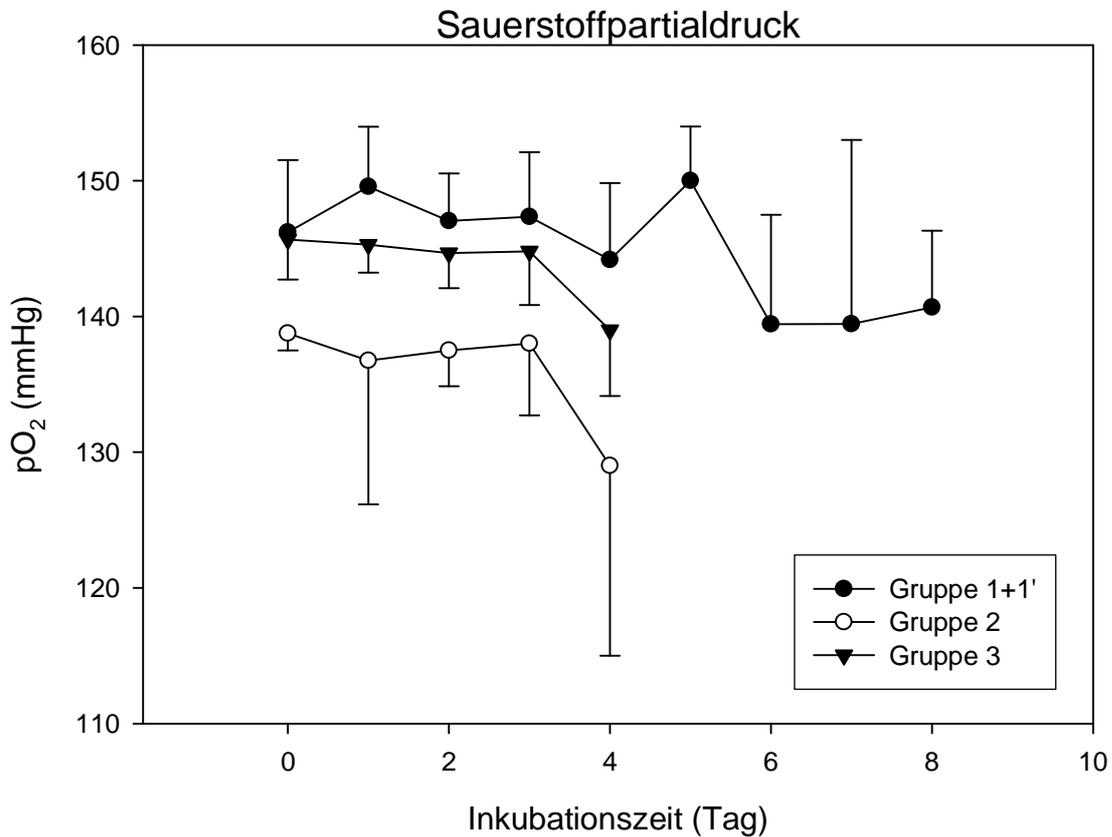


Abbildung 31 Sauerstoffpartialdrücke des Perfusionsflusses im jeweiligen Rindervenens-Inkubationsmilieu über die Zeit gemessen auf der Ausflusseite des Organzylinders

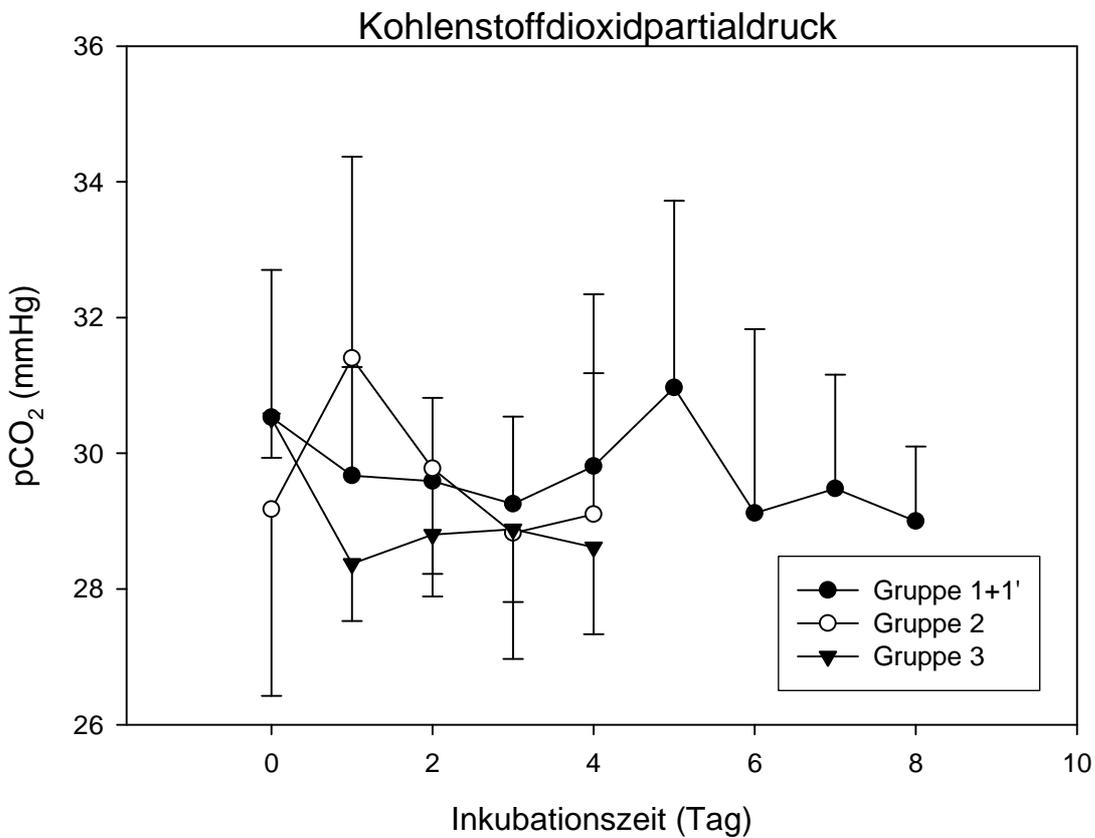


Abbildung 32 Kohlenstoffdioxidpartialdrücke des Perfusionsflusses im jeweiligen Rindervenens-Inkubationsmilieu über die Zeit gemessen auf der Ausflusseite des Organzylinders

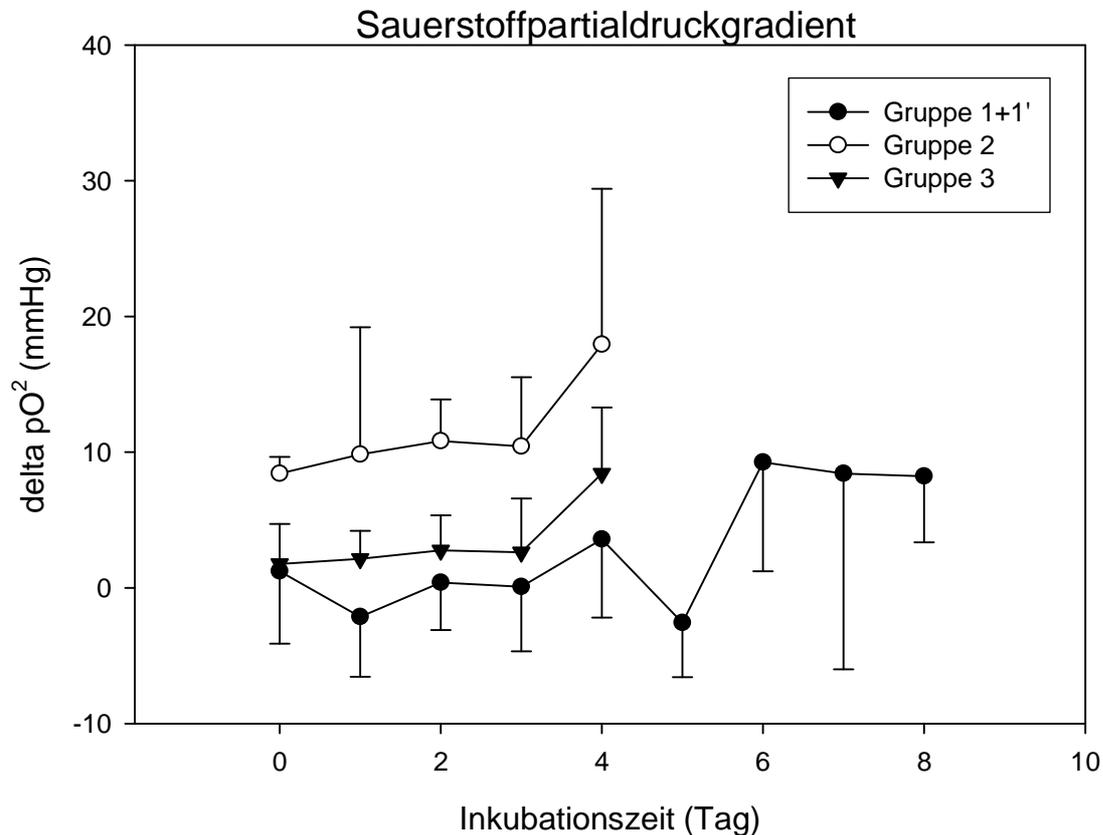


Abbildung 33 Sauerstoffpartialdruckdifferenz zwischen Organzylindereinlass und -auslass des Perfusionsflusses über die Inkubationszeit der jeweiligen Rindervenengruppe

5.2.3.2 Dextrose, Laktat und pH

In jedem Versuchs-Milieu wurde über die Zeit signifikant D-Glukose verbraucht und Laktat produziert ($p < 0,001$). Der lineare Zusammenhang konnte dabei durch Korrektur der Werte entsprechend Punkt 4.2.5.4 und anschließender linearer Regression nachgewiesen und veranschaulicht werden (Abb. 34 - 36; Tab. 16). Der statistische Vergleich der korrigierten Laktat- mit der korrigierten D-Glukosekonzentrationsänderung, zeigte keinen signifikanten Unterschied in Gruppe 1+1' ($p = 0,576$) und 2 ($p = 0,553$). In Gruppe 3 unterschieden sich die Kurven mit einer signifikant höheren Laktat-Produktion im Verhältnis zum Dextrose-Verbrauch ($p < 0,001$). In allen Gruppen fiel visuell eine innerhalb der ersten 24h verzögerte Umwandlung von Dextrose in Laktat auf (Abb. 34 - 36).

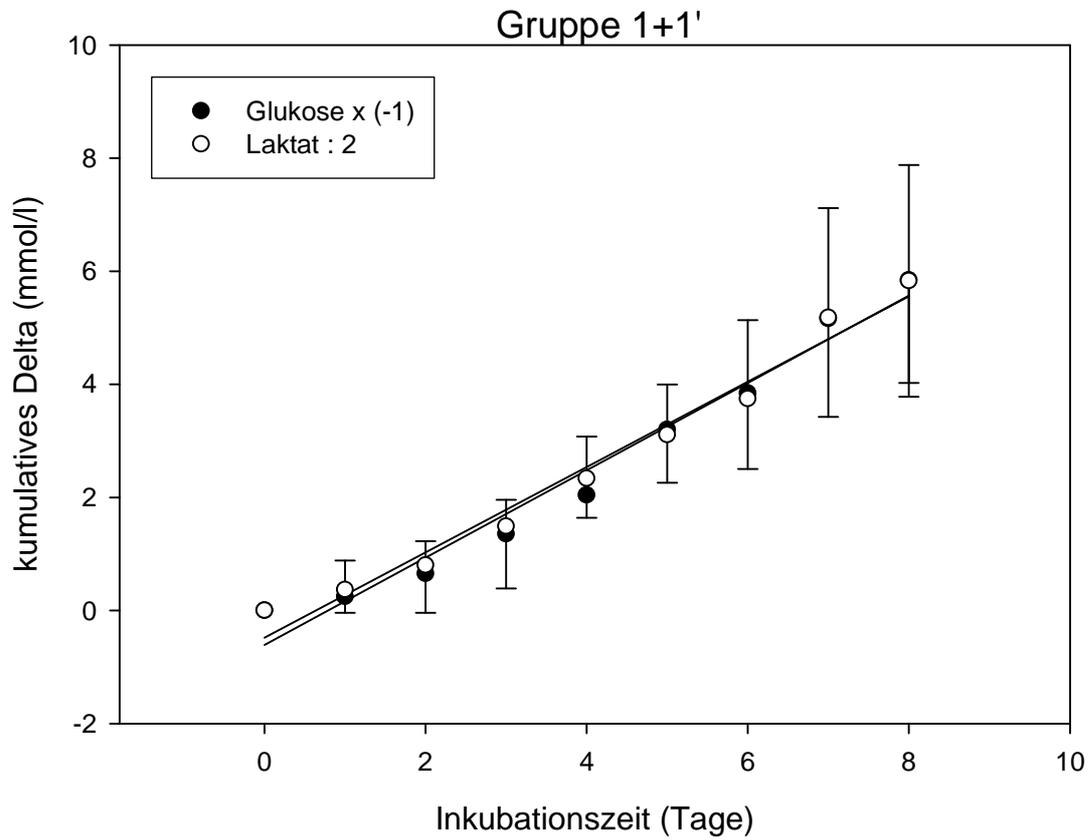


Abbildung 34 Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 1+1' nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade

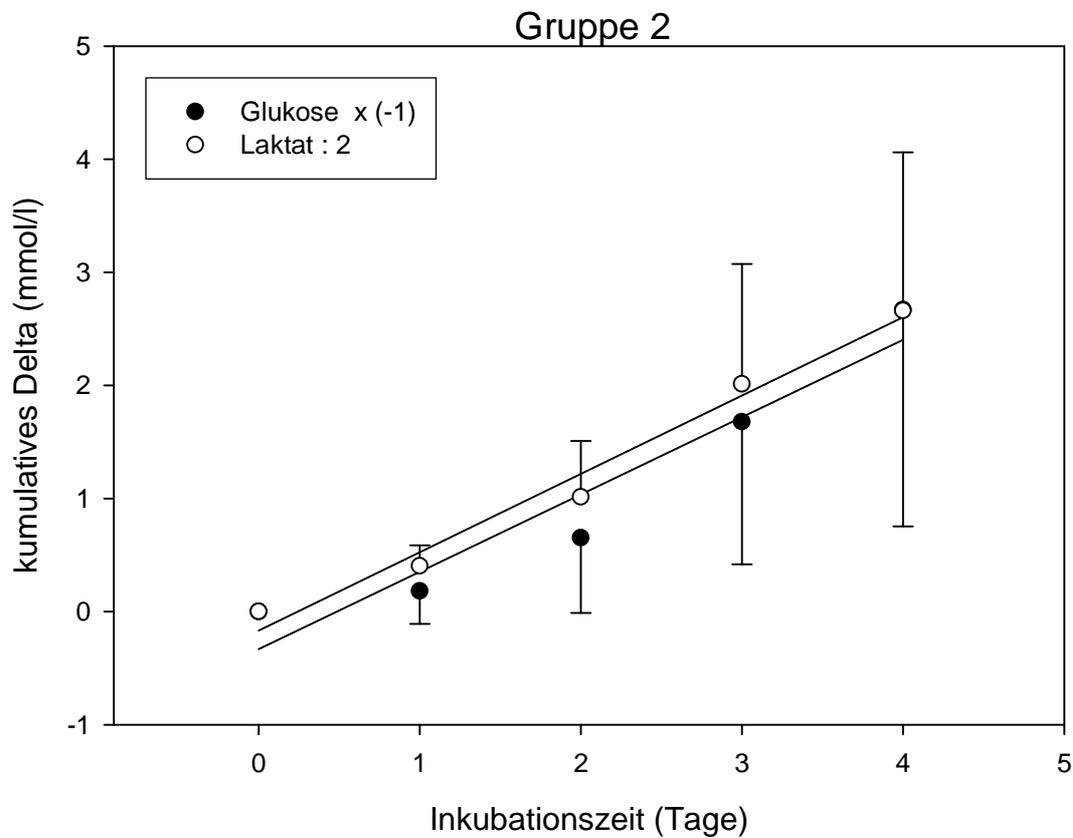


Abbildung 35 Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 2 nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade

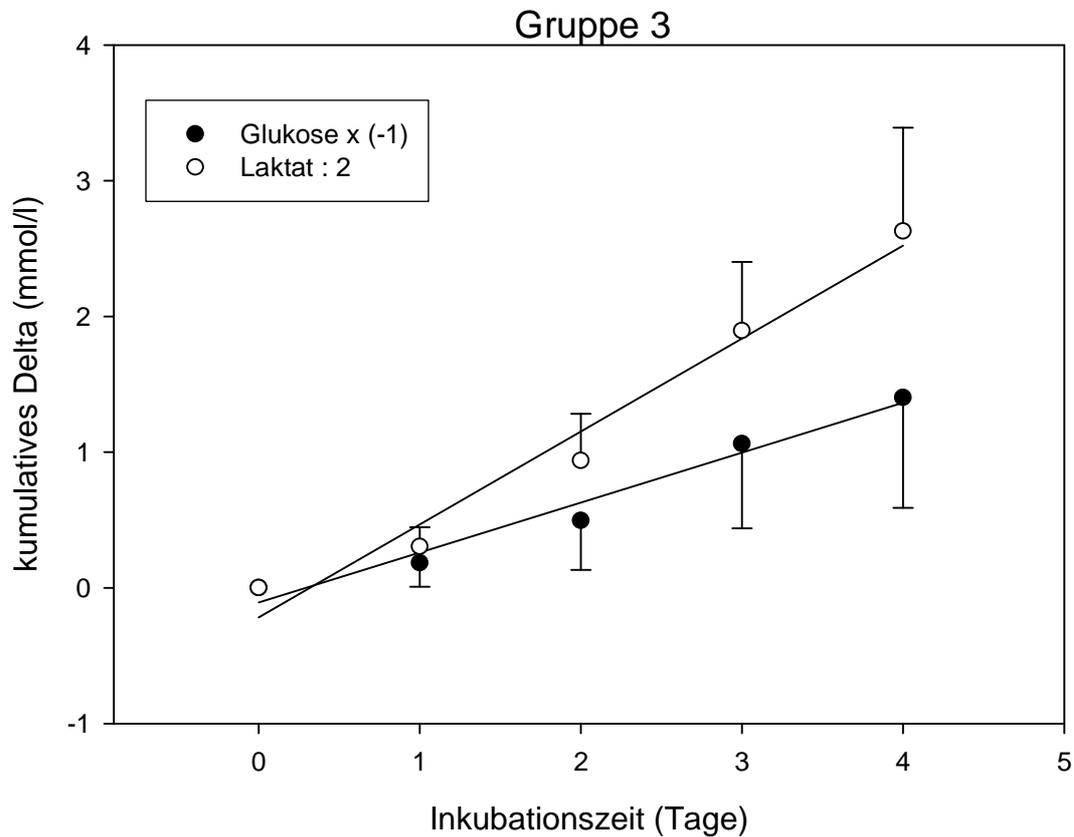


Abbildung 36 Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 3 nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade

Gruppe	1+1'	2	3
Δ [D-Glukose x (-1)] [(mmol/l) / Tag]	0,77 (0,97)	0,68 (0,92)	0,36 (0,97)
Δ [Laktat : 2] [(mmol/l) / Tag]	0,75 (0,97)	0,69 (0,97)	0,68 (0,97)

Tabelle 16 Steigung und in Klammern der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden der nach Punkt 4.2.5.4 errechneten kumulativen D-Glukose- und Laktatwerte des jeweiligen Rindervenenumkubationsmilieus

Die pH-Werte (Abb. 37) blieben in allen Gruppen stets in einem physiologischen Bereich zwischen 7,35 und 7,45 und wiesen in keiner Gruppe eine Veränderung über die Zeit auf.

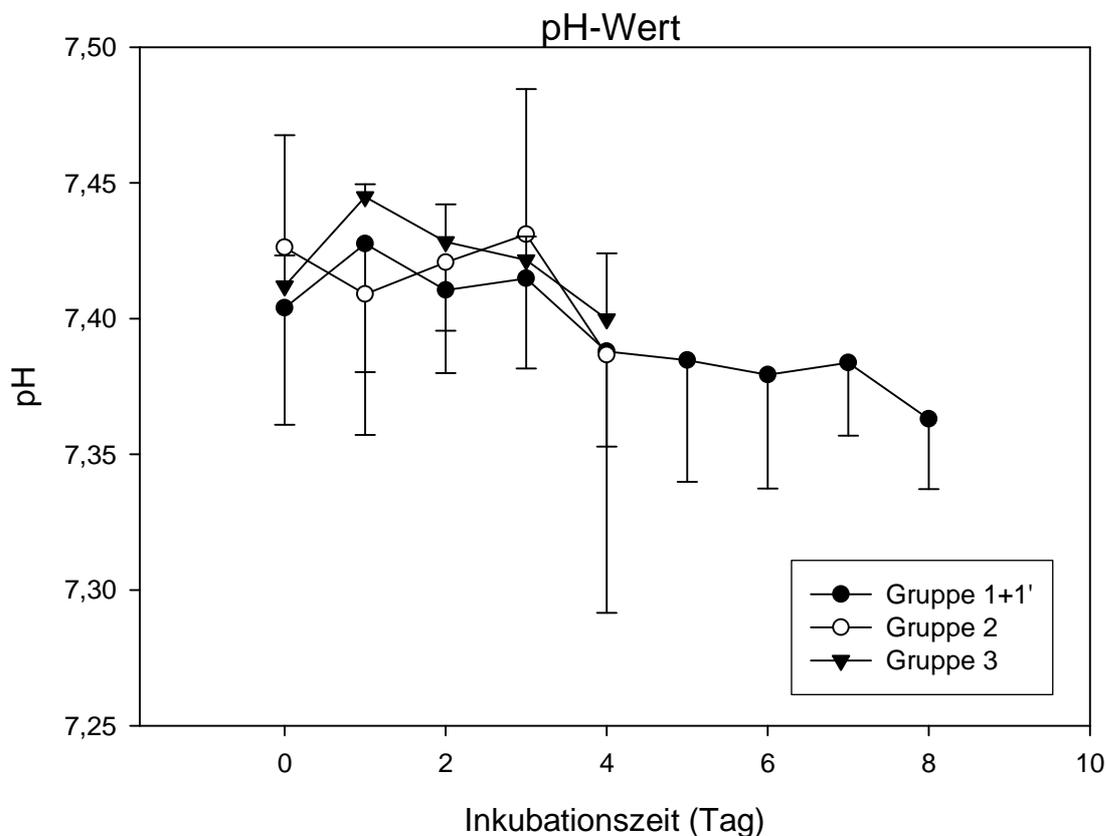


Abbildung 37 pH-Werte des Perfusionsflusses im jeweiligen Rindervenens-Inkubationsmilieu über die Inkubationszeit

5.2.3.3 Elektrolyte

Die Natriumkonzentrationen aller Versuchsmilieus (Abb. 38) stiegen von einem Bereich etwa zwischen $139,3 \pm 1,5$ mmol/l (Gruppe 2) und $140,7 \pm 1,1$ mmol/l (Gruppe 3) an Tag 0 nach zwei Tagen auf einen Bereich zwischen $151,6 \pm 4,2$ mmol/l (Gruppe 1+1') und $154,8 \pm 3,2$ mmol/l (Gruppe 3). Am folgenden Tag (3) fielen die Konzentrationen auf Werte zwischen $147,5 \pm 4,2$ mmol/l (Gruppe 1+1') und $150,1 \pm 1,5$ mmol/l (Gruppe 3). Bis zum nächsten Tag (4) erhöhten sich die Konzentrationen wieder und lagen zwischen $153,5 \pm 4,1$ mmol/l (Gruppe 1+1') und $156,2 \pm 3,9$ mmol/l (Gruppe 3). In einem relativ konstanten Bereich von $147,5 \pm 4,6$ mmol/l (Tag 7) bis $149,9 \pm 7,0$ mmol/l (Tag 5) schwankten die Werte der Gruppe 1' ab Tag 5, das Schema der Konzentrationsänderungen scheint dem der Tage 2 bis 4 zu gleichen. Die Statistik zeigte zwischen den Natriumkonzentrationen der verschiedenen Milieus insgesamt einen signifikanten Unterschied ($p=0,004$). Der Holm-Sidak Nachtest fand

diesen zwischen Gruppe 1+1' und Gruppe 3 nur unter Verwendung aller Werte, nicht im Vergleich an den einzelnen Tagen.

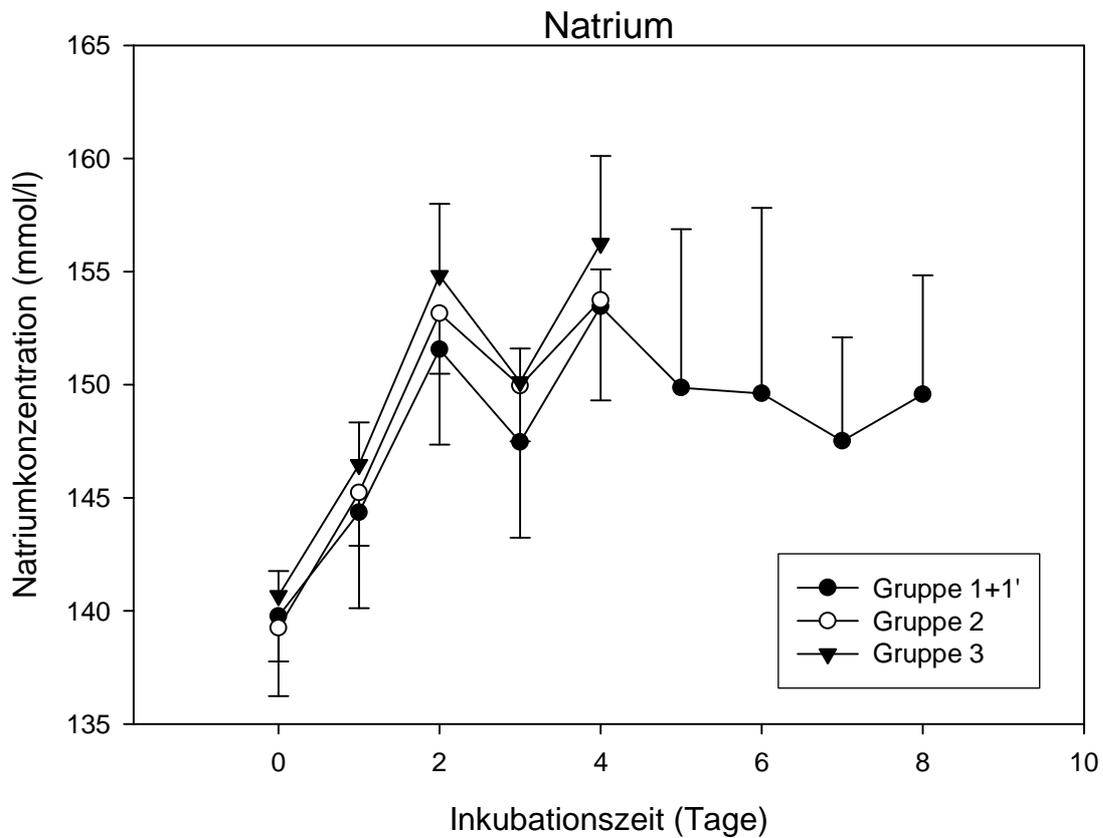


Abbildung 38 Verhalten der Natriumkonzentration im jeweiligen Rindervenensinkubationsmilieu über die Inkubationszeit

Visuell glich der Kaliumkurvenverlauf (Abb. 39) der Tage 0 bis 4 in allen Gruppen dem des Natriums, nach einem leichten Abfall, blieb die Konzentration bei Versuchen über acht Tage dann relativ konstant. Insgesamt bewegte sich die Kaliumkonzentration in einem Bereich zwischen $6,02 \pm 0,12$ mmol/l (Tag 0, Gruppe 3) und $6,81 \pm 0,44$ mmol/l (Tag 4, Gruppe 1+1'). Laut statistischer Auswertung bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied ($p=0,180$).

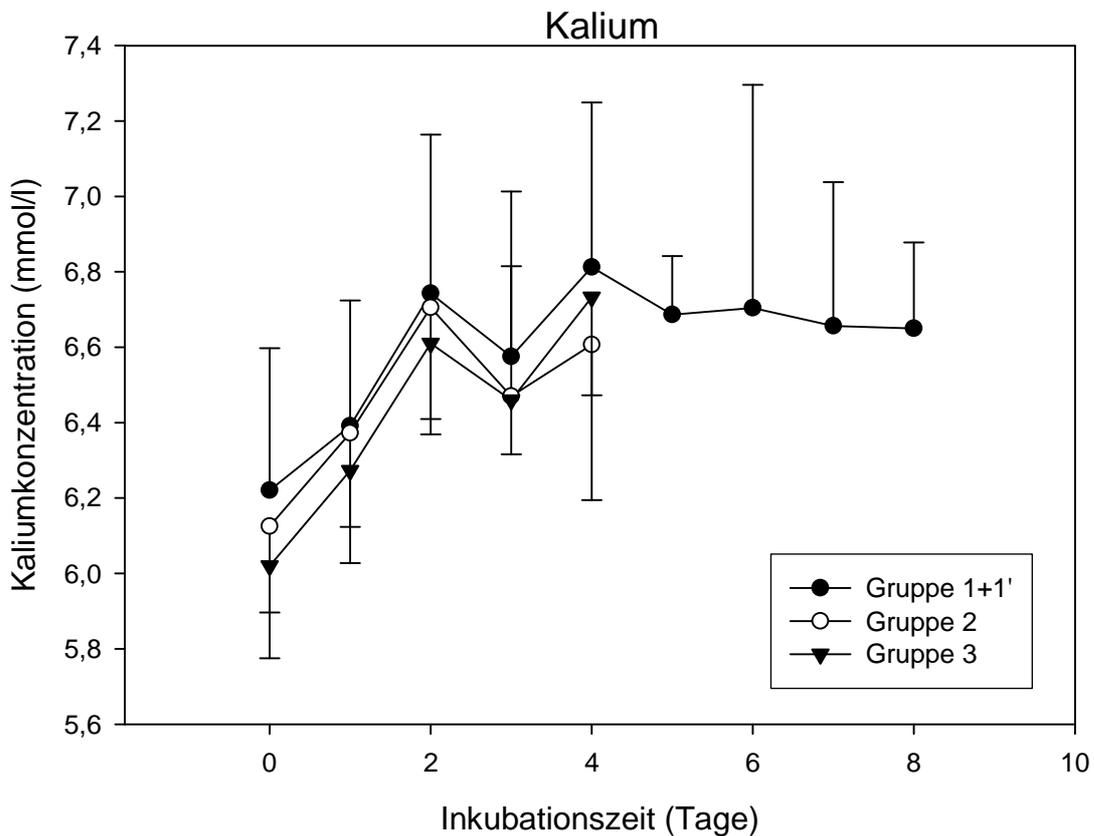


Abbildung 39 Verhalten der Kaliumkonzentration im jeweiligen Rindervenensinkubationsmilieu über die Inkubationszeit

Auch die Kurvenverläufe der Kalziumkonzentrationen (Abb. 40) entsprachen visuell dem der übrigen Elektrolyte. Die Konzentrationen der Gruppe 1+1' bewegten sich zwischen $1,40 \pm 0,09$ mmol/l (Tag 0) und $1,50 \pm 0,08$ mmol/l (Tag 5), der Gruppen 2 und 3 höher zwischen $1,51 \pm 0,07$ mmol/l (Tag 0, Gruppe 2) und $1,66 \pm 0,04$ mmol/l (Tag 2, Gruppe 3). Die Statistik bestätigte diesen Unterschied als signifikant ($p < 0,001$).

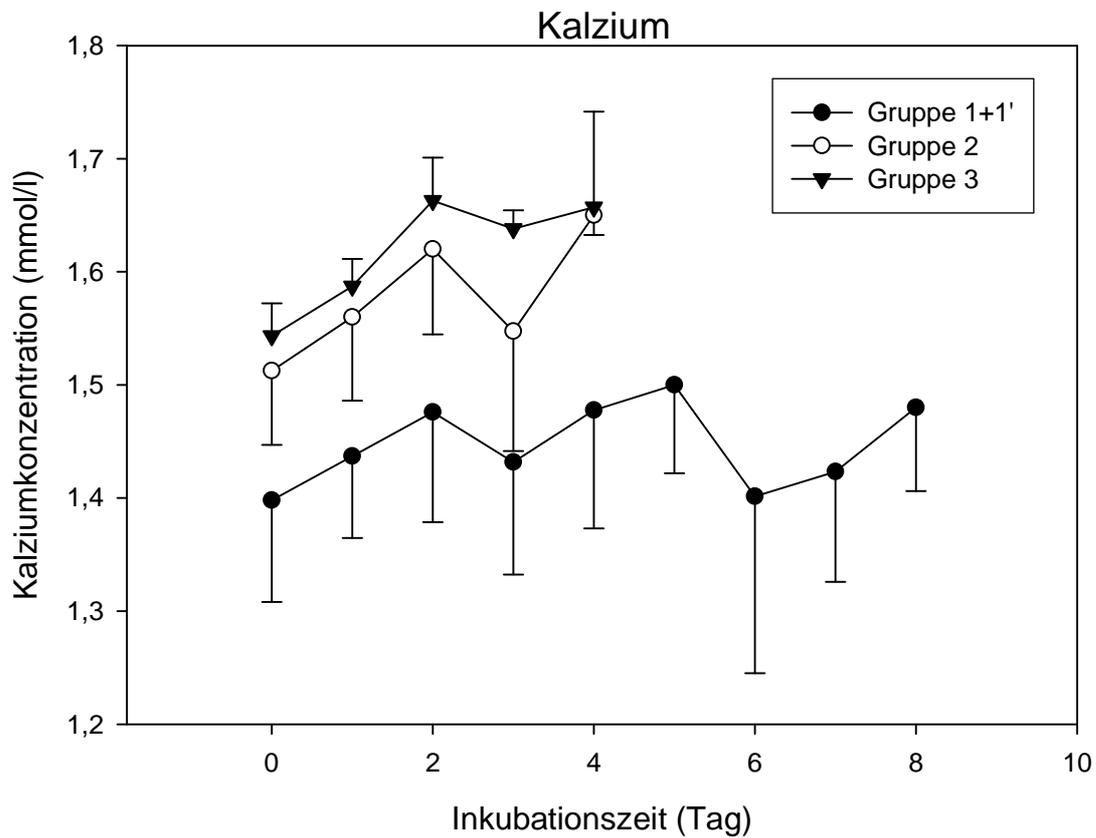


Abbildung 40 Verhalten der Kalziumkonzentration im jeweiligen Rindervenensinkubationsmilieu über die Inkubationszeit

Bezüglich Verlauf und Lage der Kurven zueinander galt für die Chloridkonzentrationen (Abb. 41) dasselbe wie für die Calciumkonzentrationen. Die Werte der Gruppe 1+1' bewegten sich zwischen 116 ± 3 mmol/l (Tag 0) und 129 ± 4 (Tag 4). Die Kurven der Gruppen 2 und 3 lagen signifikant höher als die der Gruppe 1+1' ($p < 0,001$) mit Konzentrationen zwischen 121 ± 2 mmol/l (Tag 0, Gruppe 2) und 136 ± 4 mmol/l (Tag 4, Gruppe 3).

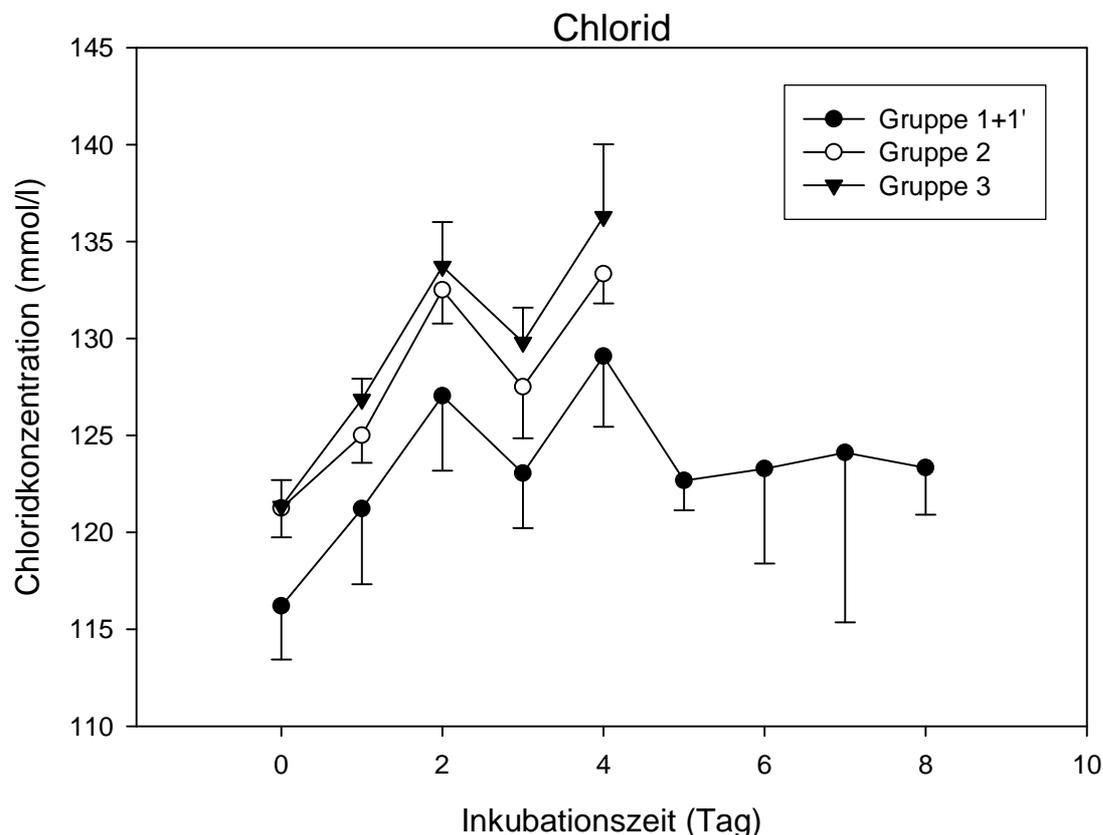


Abbildung 41 Verhalten der Chloridkonzentration im jeweiligen Rindervenensinkubationsmilieu über die Inkubationszeit

Über die Zeit bestand innerhalb jeder Gruppe für jedes Elektrolyt eine signifikante Änderung ($p < 0,001$), im Einzelnen bestätigten sich hier größtenteils die visuell sichtbaren Schwankungen.

Visuell zeigten die Kumulationen der relativen Elektrolytkonzentrationswerte jeder Gruppe einen annähernd gleichen linearen Verlauf (Abb. 42 - 44). Die lineare Regression der kumulativen relativen Elektrolytkonzentrationen ergaben bei einem Korrelationskoeffizient von mindestens 0,97 (Gruppe 1+1', Kalium) eine Änderung zwischen 3,08 % (Gruppe 1+1', Calcium) und 5,63 % (Gruppe 3, Chlorid) pro Tag (Tab. 17). In der statistischen Auswertung bestand insgesamt in jeder Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Elektrolytkumulationen (Gruppe 1+1' $p < 0,001$; Gruppe 2 $p < 0,001$; Gruppe 3 $p < 0,001$), welcher sich im Nachtest hauptsächlich zwischen Kalzium und den übrigen Elektrolyten findet. Der statistische Vergleich der kumulativen relativen Konzentrationswerte eines Elektrolyts zwischen verschiedenen Gruppen ergab einen unterschiedlichen Konzentrationsanstieg für Calcium ($p < 0,001$), zwischen Gruppe 1+1' und 3, sowie Natrium ($p < 0,001$), zwischen Gruppe 1+1' und 2 bzw. 3. Für Kalium ($p = 0,200$) und Chlorid ($p = 0,104$) bestand hier kein Unterschied.

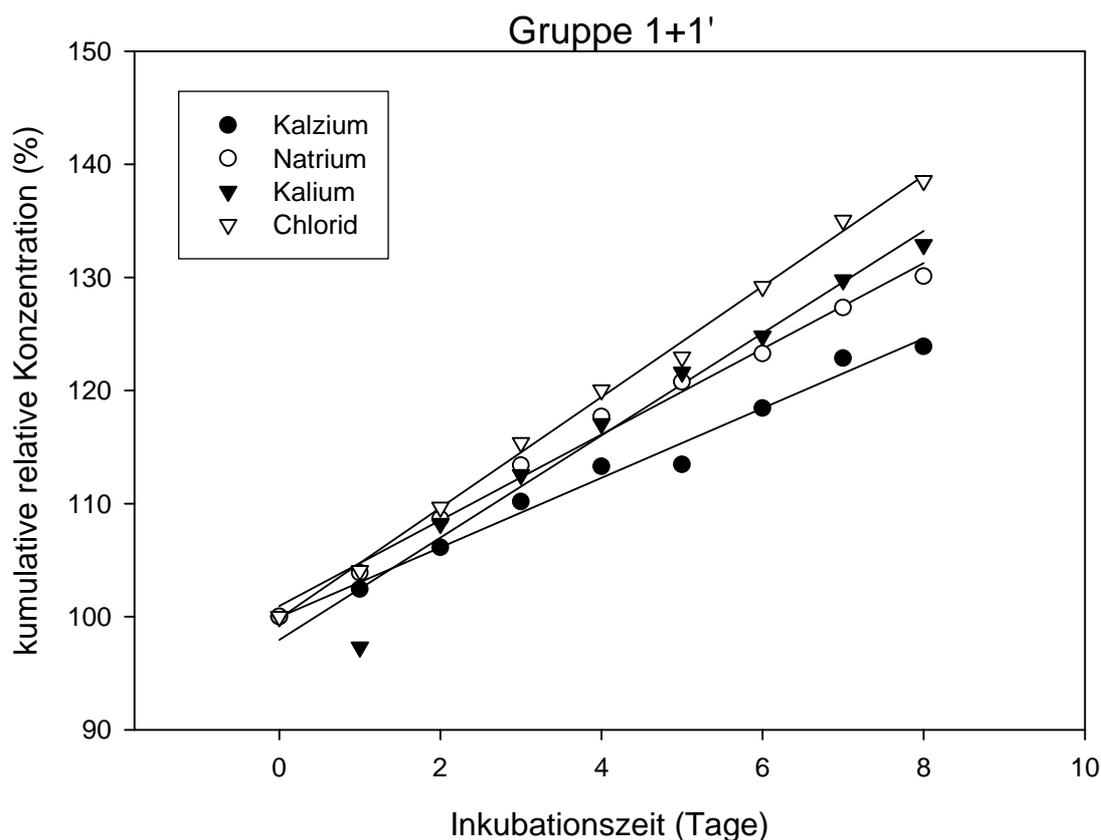


Abbildung 42 kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 1+1' über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade

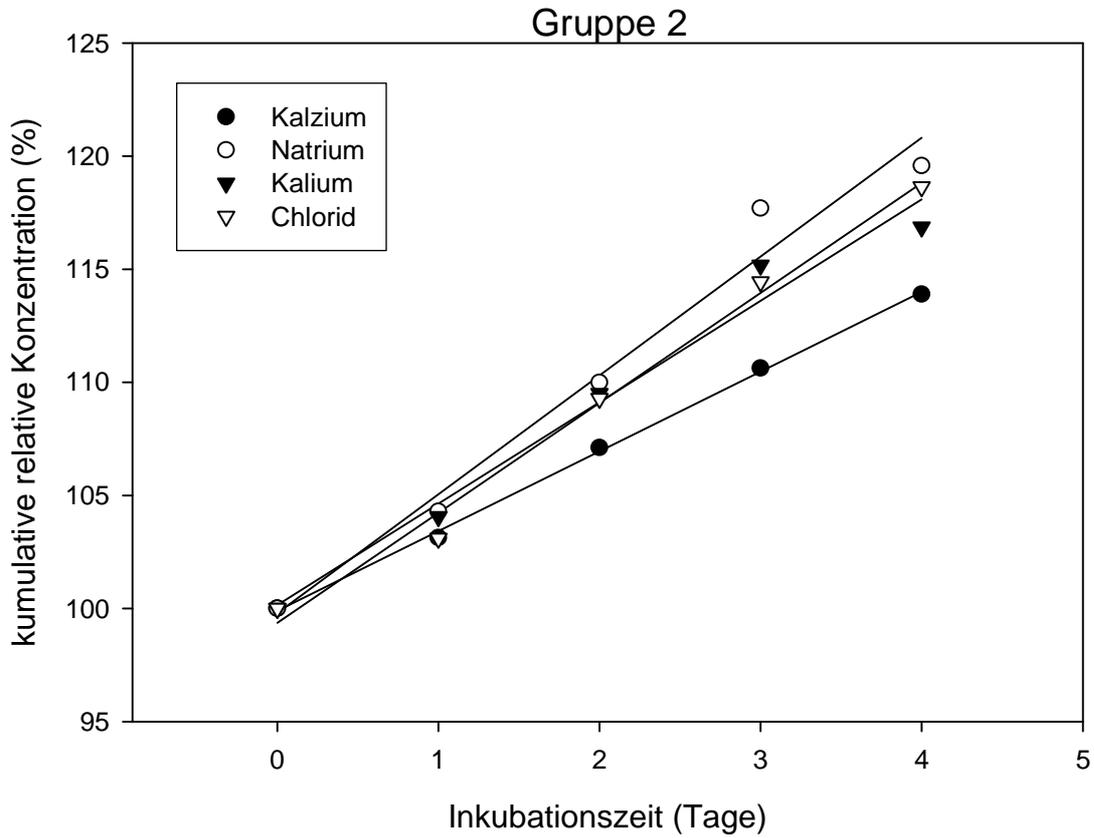


Abbildung 43 kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 2 über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade

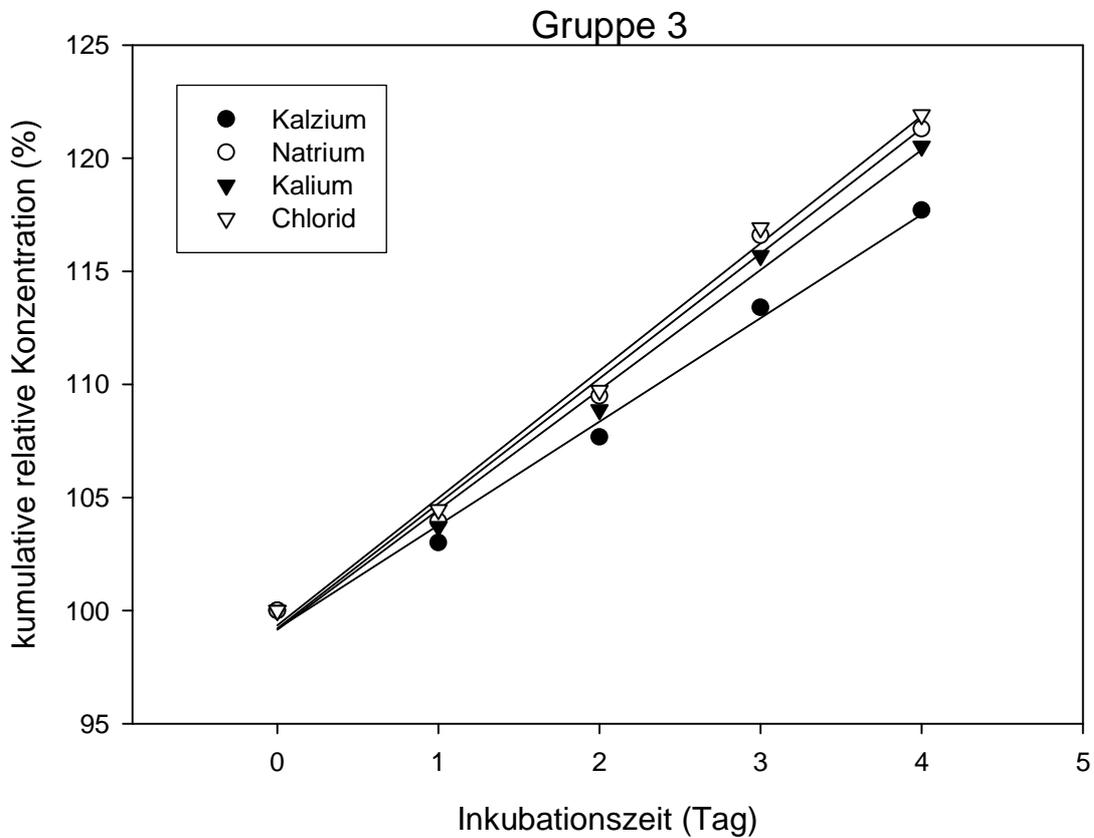


Abbildung 44 kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 3 über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade

Gruppe	1+1'	2	3
$\Delta[\text{Calcium}]$ (% / Tag)	3,08 (0,99)	3,53 (1,00)	4,58 (0,99)
$\Delta[\text{Natrium}]$ (% / Tag)	3,79 (0,99)	5,25 (0,98)	5,52 (0,99)
$\Delta[\text{Kalium}]$ (% / Tag)	4,52 (0,97)	4,48 (0,98)	5,30 (0,99)
$\Delta[\text{Chlorid}]$ (% / Tag)	4,89 (1,00)	4,86 (0,99)	5,63 (0,99)

Tabelle 17 relative Elektrolytkonzentrationsänderung pro Tag entsprechend der Regressionsgeradensteigung der nach Punkt 4.2.5.4 umgerechneten absoluten Elektrolytkonzentrationen des jeweiligen Rindervenensinkubationsmilieus; in Klammern der Korrelationskoeffizient des jeweiligen linearen Zusammenhangs

5.2.4 Histologie

Die Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte zeigte keine Änderung in der Querstruktur von Tunica externa und Tunica media bei allen Inkubationen über 4 Tage (Abb. 45; C - K). Die Tunica intima wies in Gruppe 1 einen Verlust der Endothelzellen ohne offensichtliche Veränderungen der subendothelialen Schicht auf (Abb. 45; C). In Gruppe 2 und 3, Versuchsmilieus mit Dextran, waren nach 4 Tagen noch Endothelzellen vorhanden (Abb. 45; E, G), wobei deren Dichte im Vergleich zur Endothelzellschicht an Tag 0 (Abb. 45; A) abzunehmen schien. Letzteres fiel in beiden Gruppen gleichermaßen auf. Gefäße der Gruppe 1' boten nach 8 Tagen Inkubation, zusätzlich zum kompletten Endothelverlust, Zeichen einer Schädigung der subendothelialen Schicht (Abb. 45; I).

Die TUNEL-Färbung lieferte keine Hinweise auf apoptotische Vorgänge bei Rindervenens vor Inkubation und nach Inkubation für vier Tage unter den Bedingungen der Gruppen 1, 2 und 3 (Abb. 45; B, D, F, H). Nach acht Tagen Inkubation im Rahmen der Versuchsbedingungen von Gruppe 1', zeigten sich apoptotische Zellen in allen Wandschichten der Gefäße (Abb. 45; K).

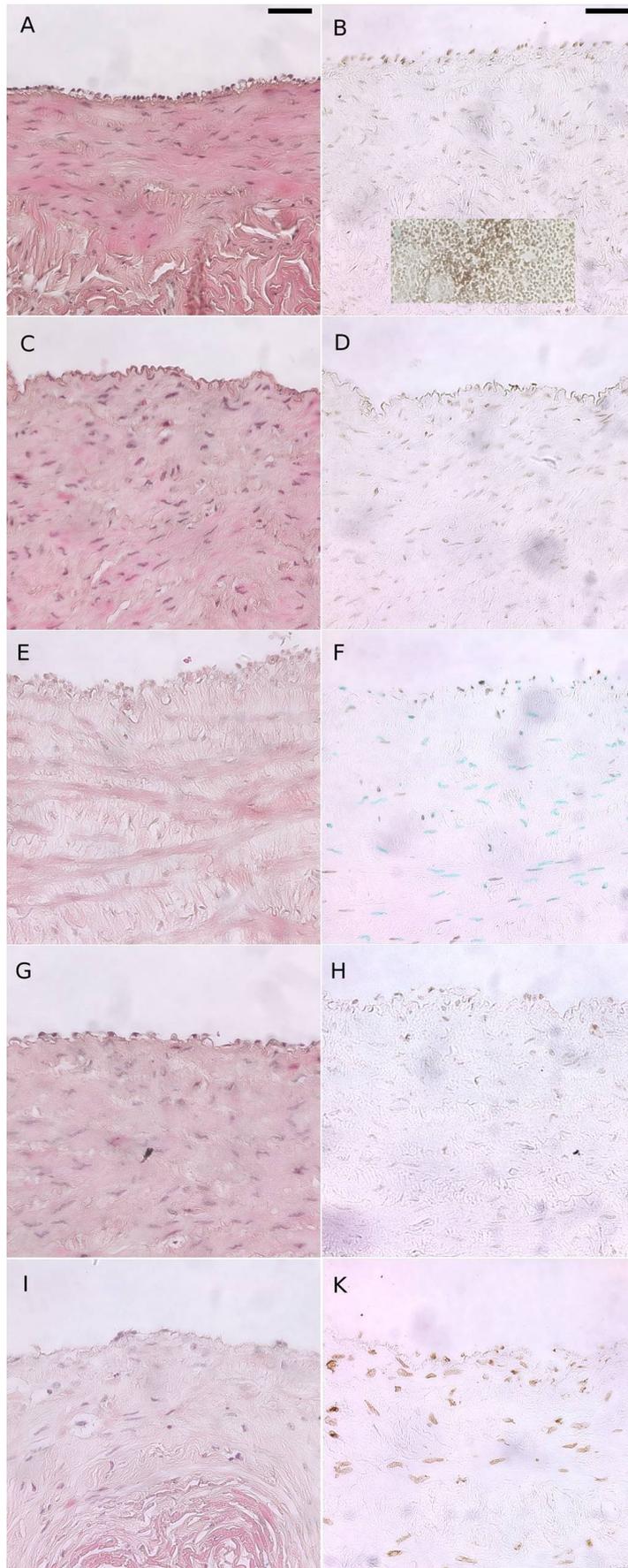


Abbildung 45 Mikroskopische Abbildungen von Rindervenenschnitten vor und nach jeweiliger Inkubation, in der linken nach HE-, in der rechten Spalte nach TUNEL-Färbung (schwarze Balken in A und B entsprechen 50 μ m, kleines Bild in B Positivkontrolle der TUNEL-Färbung an humaner Tonsille). Vor Inkubation = A und B. Nach Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 1 = C und D, der Gruppe 2 = E und F, der Gruppe 3 = G und H, der Gruppe 1' = I und K

6 Diskussion

Entsprechend der aktuellen Literatur zur Konditionierung von Blutgefäßen in Bioreaktoren stellt auch bei uns ein Nährmediumkreislauf die Basis der Anlage dar. Neben den verbindenden Schlauchteilen sind auch bei uns in diesen Kreislauf Pumpen zur Erzeugung und Beeinflussung des Nährmediumflusses, Einrichtungen zur Temperaturregulation in Form der Wärmespiralen und der Inkubationskammer, welche durch Wasser aus der Temperierungsanlage erwärmt werden, enthalten. Weitere grundsätzlich vorhandene Einheiten stellen der Inkubationszylinder, sowie das Nährmediumreservoir dar (31). Im Gegensatz zu anderen Bioreaktoren erfolgte jedoch in unserem Fall die Gasversorgung des Kreislaufes nicht über den Gasaustausch zwischen einem Inkubator und der darin platzierten Anlage (39-41), sondern durch einen Oxygenator. Dieser sollte zusammen mit einer individuellen Gasflussregulation für gleichmäßige physiologische Gaspartialdrücke innerhalb des Mediums sorgen, ein wichtiger Gesichtspunkt vor allem im Rahmen des tissue engineering (42; 43). Ein wie von uns verwendeter Hohlfaseroxygenator bietet dabei zusätzlich den Vorteil einer schnelleren und gleichmäßigeren Gasauflösung (44) sowie z.B. im Rahmen zukünftiger Versuche mit Sauerstoffträgern eine geringere Mikrotraumatisierung derselben als ein Blasen-oxygenator (45). Ein Oxygenator war jedoch auch aufgrund der bereits erwähnten fehlenden Anlageninstallation innerhalb eines Inkubators, der von außen physiologische Gaskonzentrationen bzw. – partialdrücke zur Verfügung stellt, erforderlich. Aus diesem Grund war auch der Austausch der zunächst verwendeten Silikonschläuche gegen Schlauchmaterial aus Tygon® notwendig, da erstere in Vorversuchen eine zu große Gasdurchlässigkeit aufwiesen. Da in Inkubatoren und Zellkulturen meist Dunkelheit herrscht bzw. keine direkte Sonneneinstrahlung vorliegt, wurden die Anlagen lichtundurchlässig abgedeckt, zumal Blutgefäße in der Regel keiner direkten Bestrahlung durch Sonnenlicht ausgesetzt sind und die Auswirkungen, entsprechend den Beobachtungen aus Vorversuchen ohne Lichtabschirmung mit Rindervenen, wohl eher negativ wären (46; 47). Marimoto et al konnten einen Kontraktilitätsverlust von Rattenarterien durch UV-Licht bedingten Glattmuskelzellverlust nachweisen (48), während Jacob und Tallarida eine partiell irreversible Rezeptorblockade als eine unmittelbare Auswirkung von UV-Licht auf die Kaninchen-Aorta fanden (49). Auf der anderen Seite ermöglicht die inkubatorunabhängige Anlagenstruktur eine erweiterte Flexibilität im Aufbau unterschiedlicher Versuche auf dem Feld der Blutgefäßkonditionierung, da man nicht auf den Raum eines Inkubators beschränkt

ist. Zum Beispiel ist das Gefäßmaterial während Inkubation und Konditionierung in den durchsichtigen Organzylindern für optischen Messverfahren leicht zugänglich.

Die Bedeutung hämodynamischer Kräfte im Bereich der in vitro Gefäßkonditionierung ist seit langem bekannt (50-57). In ihrer Einstellung ist jedoch, im Sinne einer großen Vielfalt der Anlagenanwendungsmöglichkeiten, eine große Flexibilität gefordert, da im Bereich der Blutgefäßkonditionierung und -züchtung eine zum Teil sehr unterschiedliche und differenzierte Hämodynamik erforderlich ist. Im Bereich der In-vitro-Züchtung von Blutgefäßen wurde beispielsweise der Vorteil pulsatiler im Vergleich zu rein laminärer Gefäßperfusion gezeigt, verschiedene Autoren konditionieren ihre Blutgefäße in vitro unter ansteigenden Perfusionsdrücken und -flüssen, um Zellen aus statischen Verhältnissen einer Zellkultur dynamisch physiologischen Bedingungen anzupassen (39; 57; 58), es wurden unterschiedliche Auswirkungen von Scherkräften verschiedener Stärke auf das Wachstum reifer und unreifer Endothelzellen sowie reife Endothelzellphänotypen erkannt (59). Für einen pulsatilen Fluss konnte ein signifikant höheres Zellwachstum humaner Umbilikalvenenendothelzellen in 3D Kulturen mit hoher Zelldichte als unter statischen Bedingungen nachgewiesen werden (60). Auf dem Gebiet der Gefäßzüchtung konnte die Zellverteilung und -zahl sowie die Produktion extrazellulärer Matrix durch eine physiologische Pulskurve gegenüber konstanten Scherkräften und einfachen spitzen Pulsen optimiert werden (61). Auch wurde eine unterschiedliche Genexpression humaner Umbilikalvenenendothelzellen unter pulsatilen im Vergleich zu konstanten Scherkräften gefunden (62). So bietet auch unsere Anlage neben unterschiedlichen Perfusatzusammensetzungen verschiedene Einstellmöglichkeiten der auf die Gefäße wirkenden Kräfte zur Optimierung der Inkubationsverhältnisse: In Kombination von Veränderung der Flussgeschwindigkeit, Nachlast und Viskosität des verwendeten Perfusats die Beeinflussung der auf das Gefäß wirkenden Scherkräfte und intraluminalen Drücke; Je nach Einstellung von Dämpferspritzenzufluss und -volumen die Einstellung unterschiedlicher Pulskurven. Durch die Pulsadaptionsmöglichkeit über die Dämpferspritzen konnte auf eine aufwendigere Pulsmodulation z.B. über Luftdrucksysteme (40; 63) oder zusätzliche Pumpen (64) verzichtet werden. Als Nachteil muss jedoch die Abhängigkeit der Pulsfrequenz von Flussgeschwindigkeit gewertet werden, da erstere durch die Rollen der Pumpe erzeugt wird und sich diese Inkubationsparameter daher nicht getrennt regulieren lassen. Da Flussrate und Pulsfrequenz nicht direkt proportional zueinander sind (Tab. 3), ist die genaue Einstellung einer bestimmten Pulsrate

derzeit nur schwer möglich. Abhilfe könnte hier unter Umständen eine entsprechende Implementierung in der Software schaffen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass sich der durch die Rollenpumpe bedingte, im Vergleich zur physiologischen Systole langsame Druckanstieg innerhalb eines Pulses als nachteilig erweisen könnte. Der weitere Druckkurvenverlauf entsprach bei entsprechender Einstellung durch die als Windkessel fungierenden Dämpferspritzen annähernd dem in der physiologischen Diastole.

Als weiterer Kernpunkt der Anlage ist der Teil zu sehen, in dem sich das zu konditionierende Blutgefäß befindet, in unserem Fall als Organzylinder bezeichnet. Im Rahmen der geforderten Flexibilität ist durch die in Länge und Durchmesser variablen Glasröhrchen, die das Gefäß aufnehmen, die Adaption an verschiedenstes Gefäßmaterial möglich. Mit im Gegensatz zu anderen Anlagen (39; 65) getrennt regulierbaren Perfusions- und Superfusionskreisläufen sind verschiedenste Inkubationsbedingungen denkbar. Insbesondere im Bereich der Blutgefäßzüchtung ermöglichen sie einen zu jedem Zeitpunkt ausreichenden Zu- und Abstrom von Nährstoffen und Stoffwechselmetaboliten. Zur Optimierung dieses Einsatzgebietes dient auch der Rotationsmechanismus des Organzylinders. Zum einen kann durch dieses Gesamtkonzept auf eine von diversen Forschergruppen angewendete zweitstufige Blutgefäßzüchtung verzichtet werden. Zusammenfassend wurden dort in einer ersten Stufe Gefäßgerüste unter statischen Bedingungen mit Zellmaterial besiedelt, in einer zweiten Stufe diese in einem Bioreaktor konditioniert (39; 40; 58; 66-68). Unsere Anlage vermeidet diese Prozedur, die das Gefäßkonstrukt durch Verunreinigung und Beschädigung gefährdet, da während intraluminal statischer Verhältnisse eine Nährstoffversorgung über die Superfusion gewährleistet ist. Der Rotationsmechanismus ermöglicht dabei die gleichmäßige Verteilung gewünschter Zellen innerhalb des zu besiedelnden Gefäßmaterials. Zum anderen ist auch eine dynamische Zellbesiedelung, bei dem eine Zellsuspension durch das zu besiedelnde Gefäßgerüst gepresst wird (65), durch die flexible Anlagenkonstruktion möglich. Zu klären bleibt dabei jedoch die Auswirkung der Rollerpumpen auf eine Zellsuspension. Außerdem sehen Arrigoni et al Vorteile für die Rotationsbesiedelung von Gefäßgerüsten (64).

Von weiterer Bedeutung für die Eignung der Anlage zu unterschiedlichster Blutgefäßkonditionierung ist die Tatsache, dass lange Inkubationszeiten möglich sind. Insbesondere im Bereich der In-vitro-Blutgefäßzüchtung sind hier je nach

Vorgehen Zeiten von bis zu einigen Wochen notwendig (65-67). Das In-Vitro-Konditionierungssystem muss in der Lage sein für diese Zeit ein physiologisches Milieu aufrecht zu erhalten. Neben einer zuverlässigen Anlagentechnik bezüglich Pumpen etc. war hier zunächst die Entwicklung des beschriebenen, möglichst kontaminationsfreien, Zusammenfügens der Anlagenkomponenten nötig, um zusammen mit dem Nährmedium beigetzten Antibiotika die notwendige Sterilität innerhalb des Anlagenmilieus über diese Zeiträume zu gewährleisten. Gleiches galt für Vorgänge, die während des Betriebs in den Anlagenkreislauf eingriffen, wie Nährmediumwechsel oder Mediumprobenentnahme. Durch Verwendung ausreichend großer Nährmediumreservoirs sollte eine ausreichende Nährstoffversorgung unter größtmöglicher Reduzierung sterilitätsgefährdender Nährmediumwechsel sichergestellt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang als auch generell ist die Kontrolle der Inkubationsbedingungen möglichst in Echtzeit. Während dies bei der Drucküberwachung innerhalb des Perfusions- und Superfusionskreislaufes möglich war, konnte dies bei den Nährmediumanalysen nur durch rezidivierende Probenanalysen erfolgen. Eine kontinuierliche Kontrolle dieser und anderer Faktoren, wie z.B. Flussgeschwindigkeit und Blutgefäßdurchmesser, wäre wünschenswert und ist prinzipiell durchführbar. Brant et al verwendeten z.B. für die nicht-invasive Messung des Außengefäßdurchmessers ein Lasersystem (69). Doroudi et al integrierten in ihre Anlage unter anderem ein pH-Meter, einen elektromagnetischen Flussdetektor, sowie verschiedene computergesteuerte Ventile. Neben einer zusätzlichen Datengewinnung konnten hier in einem weiteren Schritt bestimmte Messwerte über computergesteuerte Rückkopplungsmechanismen, zum Beispiel der pH durch pH-Wert abhängige Regulation des Gas- und damit CO₂- Zuflusses, automatisch reguliert werden (70). Diese Technik ist sehr kostenaufwendig, könnte jedoch aufgrund unseres flexiblen Anlagen-Designs, wie bereits erwähnt, jederzeit integriert werden.

Während die Daten aus den Mediumanalysen der Rinderveneningkubationen für pH, pCO₂ und pO₂ hier insgesamt eine regelrechte Anlagenfunktion bestätigen konnten, fiel in der Auswertung der Elektrolytmesswerte unabhängig von den Inkubationsbedingungen eine gleichmäßige, für jedes Elektrolyt statistisch insgesamt vergleichbare Kumulation auf. Wie die jeweiligen Kurven (Abb. 38 - 41) zeigen, wurde diese durch die Nährmediumwechsel teilweise antagonisiert. Wir gehen hier vor allem von einem verdunstungsbedingten Wasserverlust über die nicht

dampfdichten Schläuche und großen Membranflächen der Hohlfaseroxygenatoren aus. Zusätzlich sind nicht zu hundert Prozent dichte Anlagenteile zu erwägen. Neben den Verbindungsabschnitten der Anlage wäre hier ein Membranschaden des Oxygenators, welcher bei wie von uns verwendeten mikroporösen Polypropylen-Hohlfaser-Oxygenatoren in der neonatalen extrakorporalen Membranoxygenierung nach längeren Laufzeiten beobachtet wurde, mit konsekutiver Wasserverdunstung zu diskutieren (71; 72). Insgesamt lässt sich bei der verwendeten Kulturmediummenge von 300 ml und einem gesamten mittleren Konzentrationsanstieg von etwa 4,62 % / Tag ein täglicher Wasserverlust von ungefähr 14 ml berechnen. Dies ist als ein Nachteil gegenüber den bereits weiter oben angeführten Vorteilen der nicht in einem Inkubator mit annähernd 100 % Luftfeuchtigkeit installierten Anlage anzuführen. Aufgrund der ebenfalls schon erwähnten großen Flexibilität der Anlage, könnte dieser Flüssigkeitsverlust jedoch z.B. einfach durch den Anschluss eines in der Medizin handelsüblichen Perfusors mit entsprechender Flussrate ausgeglichen werden.

Während Sauerstoffverbrauch, Ansammlung von Stoffwechselmetaboliten, Nutzung vorhandener Energiequellen und Einflüsse von Elektrolyten immer von Interesse bei der Optimierung von großen Bioreaktoren (73-77) genauso wie auf dem Gebiet der Züchtung von solidem Gewebe (78; 79) waren, wurden diese Faktoren im Rahmen des „tissue engineering“ von Blutgefäßen eher vernachlässigt. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Geometrie von Blutgefäßen ausgezeichnete Voraussetzungen für eine optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung bietet, ganz im Gegensatz zu nicht vaskularisiertem Gewebe wie Knorpel. Prinzipiell ist ein Blutgefäß ein hohler Zylinder, der in unserer Anlage mittels Perfusion und Superfusion auf beiden Seiten der Gefäßwand von Nährmedium umgeben ist. Hierdurch reduziert sich der Diffusionsweg, der für die Nährstoffversorgung zurückgelegt werden muss, auf maximal eine halbe Gefäßwanddicke, normalerweise einen Millimeter oder weniger. Darüber hinaus verfügen Gefäße sowohl in vivo als auch im Fall von Perfusionssystemen in vitro durch die kontinuierliche Perfusion, in unserer Anlage zusätzlich durch die Superfusion, über einen stetigen Massenaustausch (80). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch vermuten, dass die Energieversorgung von Blutgefäßen unter in vitro Verhältnissen eher durch andere Faktoren als durch Massenaustausch und Diffusionswege eingeschränkt wird.

Die Sauerstoffversorgung ist ein kritischer Parameter in der Kultivierung von Blutgefäßen, da sich sowohl Hypoxie als auch Hyperoxie negativ auswirken (81; 82). Für vaskuläres Gewebe werden Sauerstoffpartialdrücke von 150 mmHg als ausreichend beschrieben (83). Im Rahmen unserer Inkubationsversuche wurden die Rindervenen von Medium mit einem durchschnittlichen Sauerstoffpartialdruck von $147,4 \pm 2,4$ mmHg versorgt. Bezüglich des Sauerstoffverbrauchs eines Blutgefäßes in einem Perfusionsmodell ergab eine Literatursuche zu Beginn der Versuche keine spezifischen Informationen. Jedoch ist eine Reihe von Daten aus Versuchen mit Gefäßfragmenten in Mikrorespiratoren oder Organbädern vorhanden (84). Ruhende Venae mesentericae des Rindes, die einzige Art Rindervenen in dieser Arbeit, verbrauchen dort $6,9 \text{E-}8 \text{ mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Entsprechend dem Henry-Gesetz beträgt das Löslichkeitsverhalten von Sauerstoff in wässrigen Medien bei 37°C $2 \text{E-}7 \text{ mol ml}^{-1}$. Die theoretische Obergrenze der Sauerstoffversorgung lässt sich bei einem Gesamtmediumfluss von 60 ml min^{-1} (40 ml min^{-1} Perfusions- + 20 ml min^{-1} Superfusionsfluss) auf etwa $1,2 \text{E-}5 \text{ mol min}^{-1}$ berechnen. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die ruhenden Rindervenen dem Medium Sauerstoff bis zu kritischen Levels entziehen. Dies wird durch die auf der Perfusionsausflusseite des Organzylinders gemessenen Sauerstoffpartialdruckwerte bestätigt, welche in keiner der verschiedenen Inkubationsgruppen unter 129 mmHg fielen.

Das in allen Experimenten verwendete Nährmedium (M199) enthielt D-Glukose in einer Konzentration von 1 g/l (5,6 mmol/l) als Hauptenergiequelle, denn von den meisten Zellen wird die Nutzung von extrazellulärer D-Glukose der intrazellulärer Energiequellen, wie Glykogen, vorgezogen (85). Die Analyse des D-Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion in unserer Arbeit zeigen deutlich einen glykolytischen Metabolismus in den Gruppen 1, 2 und 1'. Hierbei werden für zwei mol ATP ein mol D-Glukose, entsprechend der Stöchiometrie der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen, in zwei mol Laktat umgewandelt. Im Vergleich dazu würden unter aeroben Bedingungen, wenn D-Glukose komplett zu Kohlendioxid oxidiert würde, 38 mol ATP entstehen. Dies korreliert mit der in der Literatur zu findenden Erkenntnis, dass Blutgefäße keine erwähnenswerte oxidative Phosphorylierung betreiben (84; 86). Gruppe 3 wich insofern davon ab, da hier im Verhältnis zum D-Glukoseverbrauch signifikant mehr Laktat gebildet wurde. Geht man von einem Gewicht von etwa 1 g pro Gefäßsegment und dem Kulturmediumvolumen von 300 ml aus, resultiert hieraus eine Laktatbildung in einem Bereich zwischen $0,25$ und $0,29 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was gut mit Daten der Literatur

korreliert (84). Der glykolytische Metabolismus unter statischen Verhältnissen (87; 88) und laminarem Fluss (80) wurde bereits früher untersucht und hängt wohl mit der energieeffizienten Arbeitsweise zusammen, wenn tonische Glattmuskelfasern eine Kontraktion lange aufrecht erhalten müssen (89). Dabei ist es interessant, dass im Vergleich mit den Daten unter statischen Verhältnissen aus der Literatur weder der laminare Fluss in Gruppe 1 und 1' noch der laminare Fluss mit physiologischen Scherkräften in Gruppe 2 den D-Glukosemetabolismus beeinflusst haben. Im Gegensatz dazu bewirkte die Applikation zentrifugal wirkender Kräfte durch Erhöhung des intraluminalen Drucks in Gruppe 3 eine signifikante Änderung im Stoffwechsel. Dabei scheinen die Gefäße jedoch nicht auf einen vermehrt aeroben Metabolismus gewechselt zu haben, da dies die Laktatbildung im Verhältnis zum D-Glukoseverbrauch hätte reduzieren müssen, sondern sie produzieren mehr Laktat pro umgewandelter D-Glukose, nutzen also anscheinend noch (eine) andere Energiequelle(n). Hier ist anzumerken, dass die Untersuchung der Glykolyserate von pulmonalarteriellen Endothelzellen, welche einer sekundären pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) ausgesetzt waren, auch einen Anstieg der Glykolyserate zeigten (90). Da bei einer PAH der intraluminale Druck im Vergleich schon länger als einige Tage erhöht ist, könnte der fehlende Anstieg des Dextrosemetabolismus somit auch eine Frage der Zeit sein. Insgesamt sind bezüglich des Stoffwechsels auch die Ergebnisse der MTS-Reduktion (MTS), die eine Aussage über den metabolischen Funktionszustand von Zellen und Gewebe ermöglicht (91), zu berücksichtigen. Mit Hilfe dieses Tests ließ sich eine Aussage über die Funktion der Mitochondrien treffen, welche eine entscheidende Rolle im aeroben Zellstoffwechsel spielen. Da sich in jeder Gruppe über 4 Tage die MTS-Messwerte nicht änderten, scheint eine Schädigung der Mitochondrienfunktion, wenigstens der durch die MTS-Reduktion getesteten, bei wie oben angegebenen ausreichenden Sauerstoffkonzentrationen nicht für den anaeroben Stoffwechsel verantwortlich zu sein. Bei zusätzlich bestehendem signifikantem Sauerstoffverbrauch schienen die Gefäße verschiedene Energiequellen aerob und anaerob zu verstoffwechseln, eine Tatsache, die auch der Literatur zu entnehmen ist (80; 88; 90). So implizieren unsere Ergebnisse auch, dass eine Steigerung der intraluminal zentripetal wirkenden Kräfte, welcher hauptsächlich durch die Glattmuskelzellen entgegengewirkt wird, keine oxidative Phosphorylierung induzieren, obwohl diese Zellen eine normale Mitochondrien-Zahl und -Funktion haben (84). Im Gegenteil fanden Jones et al eine Abnahme der Zellrespiration von Endothelzellen unter dem Einfluss von Scherkräften (10 dyn/cm^2) im Vergleich zu statischen Bedingungen bei einem unseren Versuchen in etwa entsprechenden

Sauerstoffgehalt von 21 % (92), eine Tatsache, die sich im Rahmen unserer Versuche nur unter Annahme desselben Effekts bei erhöhtem intraluminalen Druck anstatt vermehrter Scherkraft und auch dann nur anhand des Vergleichs der Sauerstoffpartialdruckdifferenzen zwischen Gruppe 2 und 3 nachvollziehen lässt (siehe 5.2.3.1). Hierbei ist natürlich zu bedenken, dass in unseren Versuchen der Sauerstoffverbrauch anders gemessen wurde und auch das komplette Gefäß, nicht nur die Endothelzellschicht, betrifft. Es bleibt offen, inwiefern unterschiedlich starke Scherkräfte sich auf den oxidativen Stoffwechsel von Blutgefäßen auswirken, ähnlich den verschiedenen Effekten auf die Endothelzelldifferenzierung und -proliferation (59).

In unserem Kulturmedium stehen nun verschiedene alternative Energiequellen zur Verfügung, wie L-Glutamin, L-Leucin und L-Valin, die alle von Glattmuskelzellen zur Energiegewinnung genutzt werden können (73; 87; 88). Glattmuskelzellen von Kaninchenarterien erhöhten die Aufnahme von D-Glukose und Glutamin genauso wie die Produktion von Laktat nach elektrischer Stimulation (55). Eine genauere Analyse des Mediums nach Inkubation dürfte Aufschluss darüber geben, welche Energiequelle(n) hier zusätzlich genutzt werden. Für eine ökonomische Züchtung von Blutgefäßen dürfte es hilfreich sein herauszufinden, ob Blutgefäße in Richtung eines aeroben Stoffwechsels geführt werden können, da dies einen geringeren Nährmediumverbrauch bedeuten würde. Alternativ könnte die Mediumzusammensetzung unter Berücksichtigung der verwendeten Energiequellen verändert werden. Versuche über längere Zeit könnten zeigen, ob die Beobachtungen in Gruppe 3 bestehen bleiben oder der erhöhte luminale Druck über längere Sicht weitere Veränderungen im Stoffwechsel mit sich bringt. In allen Gruppen scheint D-Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in den ersten 24 Stunden nicht linear zu sein. Dies könnte eine Folge des Stresses vor und während der Schlachtung des Rindes sein und/oder eines Traumas während der Gefäßpräparation und/oder eine Folge eines Ischämie/Reperfusionsschadens (93).

Die kontraktile Funktion der Rindervenen konnte unter unseren Versuchsbedingungen für wenigstens 4 Tage aufrechterhalten werden. So waren die durch Kaliumchlorid (KCl) induzierten Kontraktionen der Gruppen 1, 2 und 3 vor und nach Inkubation identisch. Auch bei den Kontraktionskurven auf Noradrenalin (NE) fanden sich innerhalb der Gruppen keine Unterschiede. Zwischen den Gruppen schienen Gefäße der Gruppe 3 nach Inkubation signifikant stärker auf NE zu

reagieren als die der anderen Gruppen. Die scheinbar verbesserte Kontraktionsfunktion ist jedoch kaum auf die Versuchsbedingungen in dieser Gruppe zurückzuführen. Zum einen führt der Transport und Schlachtung der Rinder zu einer Erhöhung von Stresshormonen wie Katecholaminen. Sind die Rindervenen ihnen für längere Zeit ausgesetzt erfolgt gegenüber solchen Hormonen eine Desensibilisierung (94), welche während der Organbadversuche der Rindervenen vor Inkubation immer noch vorhanden sein könnte. Die Zeit im Bioreaktor könnte anschließend für eine Resensibilisierung ausreichen. Zum anderen könnte auch ein individuell unterschiedliches Ansprechen der Rindervenen auf Katecholamine hierfür verantwortlich sein (95), wenn man den Gruppenvergleich der Kontraktionskurven vor Inkubation berücksichtigt. Die Tatsache, dass die beiden Gruppen, welche sich hier vor Inkubation unterschieden, danach keine signifikanten Unterschiede mehr aufwiesen, jedoch alle anderen Gruppenvergleiche, lässt auch an eine Kombination der beiden beschriebenen Einflussfaktoren denken unter Umständen auch mit zusätzlichen Faktoren wie der Gefäßpräparation.

Eine endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin (ACh) und die bei höheren ACh-Konzentrationen auftretende Kontraktion, durch Erregung von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren der Endothelzellen bzw. von nikotinischen der Glattmuskelzellen, war dagegen in keiner der Gruppen 1. 2 und 3 nach Inkubation mehr nachweisbar. Dass die Rindervenen vor Inkubation auf die höchste ACh-Konzentration nicht mit einer ausgeprägten Kontraktion reagierten, führten wir auf eine nicht ausreichend lange Äquilibrierungszeit zur Lösung der durch den Schlachtstress bedingten katecholamininduzierten Kontraktion zurück. Die endothelunabhängige Relaxation auf Natrium-Nitroprussid (SNP) konnte nach vier Tagen unverändert ausgelöst werden. Dies spricht für einen Verlust der endothelialen Funktion ohne eine generelle Beeinträchtigung der Glattmuskulatur (96), wofür auch die Ergebnisse der histologischen Auswertung der entsprechenden Gruppen sprechen. Des Weiteren scheint es, angesichts der unveränderten MTS-Reduktion und Reaktion auf NE sowie SNP jedoch auf ACh nicht nachweisbaren Kontraktion der Glattmuskelzellen, hier zu einer Veränderung der Glattmuskelzellfunktion gekommen zu sein. Insbesondere, da das Endothel, welches vor Inkubation einen unmittelbaren Kontakt der nikotinergen Rezeptoren mit ACh verhinderte, nun entsprechend der Histologie nicht mehr oder nur noch aufgelockert vorhanden ist. An dieser Stelle ist auch die nach Inkubation zum Teil verstärkte Reaktion auf NE nochmals zu erwähnen. Diese könnte entsprechend aufgrund des

fehlenden bzw. aufgelockerten Endothels und der damit freiliegenden adrenergen Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur verstärkt sein. Jedoch ließen demnach durch Inkubation nicht signifikant erhöhte Kontraktionskurven bereits auf eine Schädigung der adrenergen Reaktion der glatten Muskulatur schließen.

Eindeutig ließ sich, neben dem ebenfalls vorliegenden Verlust der Reaktionen auf ACh, eine Abnahme der NE und KCl induzierten Vasokonstriktion nach 8 Tagen nachweisen. Dabei war diese interessanterweise nicht mit einer Reduktion der MTS-Reduktion verbunden, weshalb der Verlust von kontraktile Funktion nicht direkt auf eine Abnahme des Stoffwechsels zurückzuführen ist. Dies bestätigt sich auch in einer bis Tag 8 offensichtlich gleichbleibenden Linearität in D-Glukoseverbrauch und Laktatproduktion. In der histologischen Analyse fielen hier zusätzlich zu dem bereits in Gruppe 1 bestehenden kompletten Endothelverlust eine Schädigung der subendothelialen Schichten und apoptotische Zellen in der gesamten Gefäßwand auf. Vermutungen über eine beginnende Schädigung der subendothelialen Schichten in den Gruppen 1, 2 und 3 scheinen sich zu bestätigen.

Im Gegensatz zu dem kompletten Endothelverlust der Gruppen 1 und 1' waren in den Gruppen 2 und 3 noch Endothelzellen in geringerer Dichte vorhanden. Es wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass das im Perfusat dieser Gruppen vorhandene Dextran das Überleben von Endothelzellen unter Scherkräften verbessert und deren Stärke auch einen entscheidenden Einfluss auf die Endothelzellschicht hat (97; 98). Eine Untersuchung von Clerin et al (99) über den Verlust des Endothels bei Langzeitperfusionsexperimenten mit Schweinearterien ergab, dass die Endothelzellschicht erst bei subphysiologischen Flussraten und auch dann nur zum Teil zu erhalten war. Unter allen anderen Bedingungen wurde dort ein Verlust von Endothel sowie, luminal beginnend und progredient, von Glattmuskelzellen beobachtet. Die Ergebnisse unserer Arbeit deuten einen ähnlichen Prozess an.

Als Ursache für diese Degeneration kommt zunächst ein Ischämie/Reperfusionsschaden (IRS) in Betracht (93), da die Rindervenen für mindestens 30 Minuten ohne Perfusion waren. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die von Forman et al als Hauptursache des IRS beschriebene Neutrophilenmigration bei uns nicht in Betracht kommt (100). Er führt aber den Wiedereinstrom von Sauerstoff und Elektrolyten als weitere Ursache an. Unter

anderem in diesem Zusammenhang müssen die Auswirkungen des bereits angeführten Wasserverlustes mit dem damit verbundenen Elektrolytanstieg an dieser Stelle diskutiert werden. Negative Effekte hypertotonischer Salzlösungen auf Hirngewebe nach Reperfusion im Rahmen eines Schlaganfalls wurden bereits gezeigt (101). Dort konnten schädliche Auswirkungen von Natriumkonzentrationen in einem Bereich um 154 mmol/l 22 Stunden nach Reperfusion gezeigt werden. In unserer Arbeit bewegten sich die Werte nach 48h, dann jedoch über längere Zeit, in diesem Bereich. Ebenso erwähnenswert sind an dieser Stelle die im Rahmen von aortokoronarer Bypassoperationen angestellten Beobachtungen negativer Effekte hyperkaliämischer und -kalzämischer Lösungen auf verschiedene Zellfunktionen (102-107). Die fehlende Auswirkung einer Hyperkaliämie auf die Endothel vermittelte Glattmuskelrelaxation auf Acetylcholin wurde nur für einen Zeitraum bis 4 ½ Stunden gezeigt (108). An Rattennieren wurde eine Zunahme Hypoxie induzierter Gewebsschäden in Zusammenhang mit erhöhten extrazellulären Kalziumspiegeln gebracht (109). Neben diesen möglichen Auswirkungen von erhöhten Konzentrationen der einzelnen Elektrolyte, muss auch der Gesamtanstieg der Elektrolyte, die Dehydrierung, als Ursache des beobachteten Endothelzellschadens diskutiert werden. Zum Beispiel wurde die im Rahmen der Kryochirurgie auftretende Zell-Dehydrierung als ein Grund für die dabei induzierten Gewebs- (110) und insbesondere Endothelzellschäden (111) beschrieben.

Ein weiterer Diskussionspunkt bezüglich möglicher negativer Auswirkungen des Inkubationsmilieus auf die Rindervenvenen stellen die auf das Endothel wirkenden Kräfte dar. Zwar ergaben Untersuchungen, dass Scherkräfte ab einer bestimmten gewebeabhängigen Stärke die Proliferation ausgereifter Endothelzell-Phenotypen hemmen. Entsprechend Akimoto et al tritt dies jedoch erst ab Scherkräften von 5 dyn/cm² auf, bei 1 dyn/cm² konnte keine Proliferationshemmung beobachtet werden (98). Dies bestätigen Beobachtungen einer Regeneration von mechanisch denodierten Endothelzellschichten unter 1,3 - 4,1 dyn/cm² (112). Die in den Gruppen 2 und 3 wirkenden Kräfte liegen somit in einem Bereich, in dem eine Endothelproliferation möglich ist, die der Gruppen 1 und 1' darunter. Von unreifen und reifen Endothelzellen (59) ist bekannt, dass deren Proliferation, entsprechend den Erkenntnissen aus der Züchtung von Blutgefäßen (10), durch erhöhte Scherkräfte, auch bei Rindervenvenen, gefördert wird (113). Die in den Gruppen 1 und 1' wirkenden Scherkräfte könnten von daher in einem ungünstigen Bereich für eine Regeneration einer durch einen IRS geschädigten Endothelzellschicht sein. Allein

eine Schädigung der Tunica intima hätte entsprechend den Beobachtungen von Clerin et al (99) eine fortschreitende Degeneration auch der darunter liegenden Schichten zur Folge. Negative Effekte von zu niedrigen bzw. keinen Scherkräften wurden auch von Porter et al für die humane Vena saphena gezeigt. Sogar bei venösen 1 dyn/cm^2 wurde hier noch eine Intimahyperplasie beobachtet, erst bei 9 dyn/cm^2 trat diese nicht mehr auf (114). Auch andere Forschergruppen beschreiben die positiven Einflüsse höherer Scherkräfte bzw. negative zu niedriger auf die Morphologie von Blutgefäßen. So sahen Dewey et al eine „Regeneration von linearen Wunden“ bei konfluentem Endothel unter $5\text{-}10 \text{ dyn/cm}^2$ (56). Kannulierte endothelialisierte ePTFE-Grafts zeigten eine Regeneration der Endothelzellschicht an den Punktionsstellen unter 15 dyn/cm^2 (41). In vivo Experimente an Karotiden von Kaninchen, deren Endothel geschädigt und anschließende Regeneration unter physiologischem bzw. subphysiologischem Fluss untersucht wurde, bestätigen diese Beobachtungen (115). Zudem konnte für Kaninchenkarotiden gezeigt werden, dass subphysiologische Flüsse Apoptosevorgänge an Gefäßzellen auslösen (51). Genauer konnten Dimmeler et al eine Aufhebung der Apoptose, induziert durch $\text{TNF}\alpha$, und eine Reduktion der DNA-Fragmentierung unter basale Levels von Endothelzellen humaner Umbilikalvenen unter einem laminaren Fluss mit Scherkräften von 15 dyn/cm^2 nachweisen (116). 5 dyn/cm^2 waren weniger effektiv, die geringste DNA-Fragmentierung trat unter 45 dyn/cm^2 auf. Dabei ist bemerkenswert, wie die hier zu einer Apoptoseverhinderung notwendigen 15 dyn/cm^2 mit der bereits erwähnten Schubspannung korrelieren, unter der die punktierte Endothelzellschicht von ePTFE-Grafts regeneriert. Die Erkenntnisse von Clerin et al scheinen nun im Widerspruch hierzu zu stehen. Dies kann jedoch unter Berücksichtigung einiger Tatsachen relativiert werden. Genau wie bei unseren Versuchen handelt es sich um ausgereifte Blutgefäße. Für die angegebene Mediumviskosität von $0,9 \text{ cP}$ ergeben sich für die Karotiden ausgewachsener Schweine unter Annahme eines Innendurchmessers von 8 mm Scherkräfte von etwa $0,02 \text{ dyn/cm}^2$ bei 10 ml/min und $1,5 \text{ dyn/cm}^2$ bei 500 ml/min . Unter dieser physiologischen Flussrate werden somit weder physiologische Scherkräfte noch die zuvor angegebenen positiven Scherkraftbereiche erreicht. Die Ergebnisse hierunter entsprechen in etwa denen unserer Versuche. Für $0,05 - 0,1 \text{ dyn/cm}^2$ konnten Kaiser et al apoptotische humane Umbilikalvenenendothelzellen in vitro nicht mehr nachweisen (117), was die positiven Ergebnisse von Clerin et al für niedrigste Flussraten erklären könnte. Um die Erkenntnisse über niedrigere und höhere Scherkräfte als in unseren Versuchen in Konsens zu bringen, wäre eine Überlegung,

dass ein durch einen IRS geschädigtes Endothel zur Regeneration zunächst langsame Flussraten, ähnlich der Endothelialisierung im Rahmen der Züchtung von Blutgefäßen (39; 57), benötigt. Diese könnten dann über die Zeit gesteigert werden. Eine Bestätigung hierfür lässt sich in der Arbeit von Romanenko et al über den dualen Effekt von Scherkräften auf den volumenregulierten Anionenkanal (VRAC) von Rinderendothelzellen finden. Die Aktivierung des VRAC erlaubt Chlorid und anderen kleinen Osmolyten aus der Zelle zu fließen, reduziert so die intrazelluläre Osmolarität und normalisiert so das z.B. im Rahmen einer Ischämie erhöhte Zellvolumen. Die maximale VRAC-Aktivierung wurde für 1 dyn/m^2 gezeigt, Scherkräfte darüber und darunter hatten weniger Effekt, $5\text{-}10 \text{ dyn/m}^2$ eine stark unterdrückende Wirkung (118). Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu sagen, dass auch in der Literatur, soweit unsere Recherche ergab, kein eindeutiger Konsens über die Auswirkung von Scherkräften auf Endothelzellen herrscht, was wohl unter anderem auf die im Detail sehr unterschiedlichen Versuchsanordnungen zurückzuführen ist. Jedoch lässt sich aus den Ergebnissen der aufgeführten Literatur und unserer Versuche schlussfolgern, dass ein Volumenfluss und damit wirkende Scherkräfte sich nicht in jedem Fall positiv auf ausgereifte Blutgefäße auswirken bzw. je nach Gewebeart und Zeitpunkt einer in vitro Inkubation eventuell gleiche Scherkräfte unterschiedliche Effekte haben.

Eine weitere Ursache der beobachteten Gefäßdegeneration besteht möglicherweise in einem Unterschied von Nährstoffbedarf und -versorgung je nach Entwicklungsstadium des verwendeten Gefäßmaterials. Die Zahl der zu versorgenden Zellen ist in einem heranwachsenden Blutgefäß logischerweise erheblich geringer als in einem voll ausgereiften Gefäß. Zudem ist die Struktur in diesen gezüchteten unreifen Gefäßen anfangs lockerer und die Adventitia nicht derart ausgereift (58; 68; 113), was eine auch dort vorliegende Nährstoffversorgung von intra- und extraluminal erleichtern könnte. Schließlich wurden viele der Erkenntnisse über reife und unreife Endothelzellen unter Flussbedingungen anhand einer einzelnen Endothelzellschicht auf diversen Gerüsten ohne Glattmuskel und Bindegewebsschicht gewonnen, z.B. (39; 57; 119; 120). In diesem Zusammenhang ist auch überlegenswert, inwiefern sich heranwachsende Gefäße an eine extraluminale Nährstoffversorgung besser adaptieren als ausgereifte Gefäße. Denn es liegt in unserem in vitro Modell zwar eine zusätzliche Versorgung der Gefäßwand über den Nährmediumfluss der Superfusion vor, es ist jedoch fraglich, inwieweit diese die Vasa vasorum ausgereifter Gefäße ersetzen kann. Prinzipiell lässt sich

diskutieren, inwiefern unter in vitro Verhältnissen gezüchtetes Gewebe besser an dieses Milieu angepasst ist als in vivo ausgereiftes Gewebe. Dass hier Unterschiede bestehen könnten zeigt die Arbeit von Chappell et al, welche eine unterschiedliche Dicke der Glykokalyx von menschlichen Umbilikalvenen ex vivo und in vitro zeigen konnten (121).

7 Zusammenfassung

Studien zur Konditionierung von Gefäßmaterial verschiedenster Art in vitro erfordern ein Kreislaufmodell, welches zum einen weitgehend physiologische Verhältnisse zur Verfügung stellt und zum anderen eine größtmögliche Flexibilität in der Beeinflussung der Konditionierungsparameter und in der Methode der Messwerterhebung bietet. Auf Basis der derzeitigen Literatur über Bioreaktoren und Erkenntnisse zur Blutgefäßkonditionierung entwickelten wir ein neuartiges Perfusions-/Superfusionssystem, welches den zu Beginn genannten Forderungen gerecht werden soll. Für einen routinemäßigen Betrieb und Erstellung physiologischer Milieus auch über längere Zeiträume wurde die Anlage weiter optimiert und verschiedene Methodiken erarbeitet. Der Bioreaktor ist in der Lage physiologische Druckkurven, Pulsationen, Volumenflüsse und Gaspartialdrücke zu erstellen, eine Änderung dieser Parameter ist jederzeit möglich. Durch Superfusionsfluss und Rotationseinrichtung wird eine Blutgefäßzüchtung durch Rotationsbesiedelung mit extraluminale Nährstoffversorgung durchführbar. Zur direkten Bestätigung einiger dieser Anlageneigenschaften wurden Rindervenen über vier und acht Tage sowie unter physiologischen Scherkräften ($2,2 \text{ dyn/cm}^2$ gegenüber $0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und unter zusätzlichem intraluminalen Druck (20 mmHg) über vier Tage inkubiert. Dabei wurden täglich Messungen von Elektrolyt- Glucose- und Laktatkonzentrationen sowie Gaspartialdrücken und pH-Wert vorgenommen, außerdem Gefäßfunktion und -morphologie vor und nach Inkubation bestimmt. Es zeigten sich konstante pCO_2 - und pH-Werte. Die Elektrolytkonzentrationen stiegen leicht an, am ehesten durch konstanten minimalen Wasserverlust (ca. 4,62 %/Tag) bedingt, welcher sich z.B. durch einen Perfusor leicht ausgleichen ließe. Entsprechend den Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks über die Rindervene sowie der Laktat- und D-Glukosekonzentrationen über die Zeit präsentierten die Rindervenvenen neben einem aeroben Stoffwechsel einen anaeroben Stoffwechsel mit einem glykolytischen Metabolismus unter allen Inkubationsbedingungen außer unter erhöhten Scherkräften mit zusätzlichem intraluminalen Druck. Letztere bewirkten eine im Vergleich zu dem Verbrauch von D-Glukose vermehrte Laktatproduktion, was eine anaerobe Verstoffwechslung weiterer derzeit noch unklarer Substanzen vermuten lässt.

Unser Perfusions-/Superfusionssystem ist zusammen mit der entwickelten Methodik in der Lage Blutgefäßforschung und -konditionierung, insbesondere im Bereich der Blutgefäßzüchtung, in vitro zu betreiben und somit dazu beizutragen, Ansatzpunkte für das Verständnis und die Behandlung vaskulärer Krankheitsbilder zu liefern.

8 Literaturverzeichnis

Reference List

1. **Aoki J, Ong AT, Arampatzis CA, Vijaykumar M, Rodriguez Granillo GA, Disco CM and Serruys PW.** Comparison of three-year outcomes after coronary stenting versus coronary artery bypass grafting in patients with multivessel coronary disease, including involvement of the left anterior descending coronary artery proximally (a subanalysis of the arterial revascularization therapies study trial). *Am J Cardiol* 94: 627-631, 2004.
2. **Gruberg L, Milo S, Ben Tzvi M, Lotan C, Merin G, Braun S, Mohr R, Tzivoni D, Bitran D and Beyar R.** Comparison of bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease: results from the ARTS trial in Israel. *Isr Med Assoc J* 5: 539-542, 2003.
3. **Hannan EL, Racz MJ, Walford G, Jones RH, Ryan TJ, Bennett E, Culliford AT, Isom OW, Gold JP and Rose EA.** Long-term outcomes of coronary-artery bypass grafting versus stent implantation. *N Engl J Med* 352: 2174-2183, 2005.
4. **Taylor LM, Jr., Edwards JM and Porter JM.** Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. *J Vasc Surg* 11: 193-205, 1990.

5. **Cameron A, Davis KB, Green G and Schaff HV.** Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period. *N Engl J Med* 334: 216-219, 1996.
6. **Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S and Montefusco C.** Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery* 85: 253-256, 1979.
7. **Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G and Salacinski HJ.** Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 26: 307-320, 2002.
8. **Klinkert P, Post PN, Breslau PJ and van Bockel JH.** Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 27: 357-362, 2004.
9. **Kashyap VS, Ahn SS, Quinones-Baldrich WJ, Choi BU, Dorey F, Reil TD, Freischlag JA and Moore WS.** Infrapopliteal-lower extremity revascularization with prosthetic conduit: a 20-year experience. *Vasc Endovascular Surg* 36: 255-262, 2002.
10. **Hoenig MR, Campbell GR and Campbell JH.** Vascular grafts and the endothelium. *Endothelium* 13: 385-401, 2006.

11. **Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS and Chen C.** Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys* 24: 173-183, 2002.
12. **Harris L, O'brien-Irr M and Ricotta JJ.** Long-term assessment of cryopreserved vein bypass grafting success. *J Vasc Surg* 33: 528-532, 2001.
13. **Dardik H, Ibrahim IM, Sussman B, Kahn M, Sanchez M, Klausner S, Baier RE, Meyer AE and Dardik II.** Biodegradation and aneurysm formation in umbilical vein grafts. Observations and a realistic strategy. *Ann Surg* 199: 61-68, 1984.
14. **Dardik H, Wengerter K, Qin F, Pangilinan A, Silvestri F, Wolodiger F, Kahn M, Sussman B and Ibrahim IM.** Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization: an analysis of 1275 cases. *J Vasc Surg* 35: 64-71, 2002.
15. **Dardik H.** The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization. *Cardiovasc Surg* 3: 265-269, 1995.
16. **Castier Y, Leseche G, Palombi T, Petit MD and Cerceau O.** Early experience with cryopreserved arterial allografts in below-knee revascularization for limb salvage. *Am J Surg* 177: 197-202, 1999.

17. **Tiwari A, Salacinski HJ, Punshon G, Hamilton G and Seifalian AM.**
Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach. *FASEB J* 16: 791-796, 2002.
18. **Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G and Warnock DF.**
Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg* 5: 376-382, 1987.
19. **Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A and Carson RJ.** The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl* 15: 241-278, 2001.
20. **Berger K, Sauvage LR, Rao AM and Wood SJ.** Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 175: 118-127, 1972.
21. **Levick JR.** An introduction to cardiovascular physiology, 4Ed. 31-10-2003. London, Hodder and Stoughton.
22. **Furchgott RF and Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
23. **Autio I, Malo-Ranta U, Kallioniemi OP and Nikkari T.** Cultured bovine aortic endothelial cells secrete factor(s) chemotactic for aortic smooth muscle cells. *Artery* 16: 72-83, 1989.

24. **Cybulsky MI and Gimbrone MA, Jr.** Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791, 1991.
25. **Casscells W.** Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 86: 723-729, 1992.
26. **Tiwari A, Salacinski HJ, Hamilton G and Seifalian AM.** Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 21: 193-201, 2001.
27. **Sales KM, Salacinski HJ, Alobaid N, Mikhail M, Balakrishnan V and Seifalian AM.** Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology. *Trends Biotechnol* 23: 461-467, 2005.
28. **Rashid ST, Salacinski HJ, Hamilton G and Seifalian AM.** The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review. *Biomaterials* 25: 1627-1637, 2004.
29. **Baguneid MS, Seifalian AM, Salacinski HJ, Murray D, Hamilton G and Walker MG.** Tissue engineering of blood vessels. *Br J Surg* 93: 282-290, 2006.
30. **Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, Bordenave L, Hamilton G and Seifalian AM.** Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol Biol (Paris)* 53: 599-612, 2005.

31. **Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE and Pandit A.** Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng* 31: 1017-1030, 2003.
32. **Mertsching H and Hansmann J.** Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 112: 29-37, 2009.
33. **Conte MS.** The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? *FASEB J* 12: 43-45, 1998.
34. **Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C and Sumpio BE.** Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg* 41: 349-354, 2005.
35. **Jakubas-Przewlocka J.** Locomotion of human granulocytes in viscous media. *Med Sci Monit* 8: BR408-BR413, 2002.
36. **Paszkwiaak JJ and Dardik A.** Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg* 37: 47-57, 2003.
37. **Berridge MV, Herst PM and Tan AS.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11: 127-152, 2005.

38. **Hoenicka M, Lehle K, Jacobs VR, Schmid FX and Birnbaum DE.**
Properties of the human umbilical vein as a living scaffold for a tissue-engineered vessel graft. *Tissue Eng* 13: 219-229, 2007.
39. **Dunkern TR, Paulitschke M, Meyer R, Buttemeyer R, Hetzer R, Burmester G and Sittinger M.** A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 18: 105-110, 1999.
40. **Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H and Hetzer R.** Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng* 8: 863-870, 2002.
41. **Mall JW, Philipp AW, Rademacher A, Paulitschke M and Buttemeyer R.** Re-endothelialization of punctured ePTFE graft: an in vitro study under pulsed perfusion conditions. *Nephrol Dial Transplant* 19: 61-67, 2004.
42. **Malda J, Klein TJ and Upton Z.** The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng* 13: 2153-2162, 2007.
43. **Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B and Ma T.** Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207: 331-339, 2006.

44. **Ferguson ER, Clymer JJ, Spruell RD and Holman WL.**
Perfluorocarbon oxygen transport. A comparative study of four oxygenator designs. *ASAIO J* 40: M649-M653, 1994.
45. **Iwahashi H, Yuri K and Nose Y.** Development of the oxygenator: past, present, and future. *J Artif Organs* 7: 111-120, 2004.
46. **Izzotti A, D'Agostini F, Balansky R, Degan P, Pennisi TM, Steele VE and De Flora S.** Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta. *Mutat Res* 644: 38-42, 2008.
47. **Moller P, Wallin H, Holst E and Knudsen LE.** Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. *FASEB J* 16: 45-53, 2002.
48. **Morimoto Y, Kohyama S, Nakai K, Matsuo H, Karasawa F and Kikuchi M.** Long-term effects of UV light on contractility of rat arteries in vivo. *Photochem Photobiol* 78: 372-376, 2003.
49. **Jacob LS and Tallarida RJ.** Further studies on the action of ultraviolet light on vascular smooth muscle: effect of partial irreversible receptor blockade. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 225: 166-176, 1977.
50. **Moore JE, Jr., Burki E, Suciu A, Zhao S, Burnier M, Brunner HR and Meister JJ.** A device for subjecting vascular endothelial cells to both fluid shear stress and circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng* 22: 416-422, 1994.

51. **Cho A, Mitchell L, Koopmans D and Langille BL.** Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 81: 328-337, 1997.
52. **Kakisis JD, Liapis CD and Sumpio BE.** Effects of cyclic strain on vascular cells. *Endothelium* 11: 17-28, 2004.
53. **Davies PF.** Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519-560, 1995.
54. **Osol G.** Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 32: 275-292, 1995.
55. **Heinle H, Sigg G, Reich A and Thiedemann KU.** Metabolic effects of direct current stimulation on cultured vascular smooth muscle cells. *Z Naturforsch [C]* 39: 1141-1144, 1984.
56. **Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr. and Davies PF.** The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103: 177-185, 1981.
57. **Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R and Hetzer R.**
Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. *Int J Artif Organs* 24: 235-242, 2001.
58. **Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W, Martin DP, Degenkolbe I, Wahlers T and Stock UA.** Tissue engineering of ovine aortic blood

vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng* 32: 212-222, 2004.

59. **Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q and Chen C.** Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng* 33: 772-779, 2005.
60. **Chouinard JA, Gagnon S, Couture MG, Levesque A and Vermette P.** Design and validation of a pulsatile perfusion bioreactor for 3D high cell density cultures. *Biotechnol Bioeng* 2009.
61. **Narita Y, Hata K, Kagami H, Usui A, Ueda M and Ueda Y.** Novel pulse duplicating bioreactor system for tissue-engineered vascular construct. *Tissue Eng* 10: 1224-1233, 2004.
62. **Yee A, Bosworth KA, Conway DE, Eskin SG and McIntire LV.** Gene expression of endothelial cells under pulsatile non-reversing vs. steady shear stress; comparison of nitric oxide production. *Ann Biomed Eng* 36: 571-579, 2008.
63. **Thompson CA, Colon-Hernandez P, Pomerantseva I, MacNeil BD, Nasser B, Vacanti JP and Oesterle SN.** A novel pulsatile, laminar flow bioreactor for the development of tissue-engineered vascular structures. *Tissue Eng* 8: 1083-1088, 2002.

64. **Arrigoni C, Chitto A, Mantero S and Remuzzi A.** Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid. *Biotechnol Bioeng* 100: 988-997, 2008.
65. **Zhao F and Ma T.** Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng* 91: 482-493, 2005.
66. **L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L and Auger FA.** A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12: 47-56, 1998.
67. **Nasseri BA, Pomerantseva I, Kaazempur-Mofrad MR, Sutherland FW, Perry T, Ochoa E, Thompson CA, Mayer JE, Jr., Oesterle SN and Vacanti JP.** Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation. *Tissue Eng* 9: 291-299, 2003.
68. **Teebken OE, Bader A, Steinhoff G and Haverich A.** Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 19: 381-386, 2000.
69. **Brant AM, Shah SS, Rodgers VG, Hoffmeister J, Herman IM, Kormos RL and Borovetz HS.** Biomechanics of the arterial wall under simulated flow conditions. *J Biomech* 21: 107-113, 1988.

70. **Gan L, Sjogren LS, Doroudi R and Jern S.** A new computerized biomechanical perfusion model for ex vivo study of fluid mechanical forces in intact conduit vessels. *J Vasc Res* 36: 68-78, 1999.
71. **Lawson DS and Holt D.** Insensible water loss from the Jostra Quadrox D oxygenator: an in vitro study. *Perfusion* 22: 407-410, 2007.
72. **Alexander PJ, Lawson DS, Cornell J, Craig DM and Cheifetz IM.** Insensible water loss from the medtronic minimax oxygenator: an In Vitro study. *ASAIO J* 52: 206-210, 2006.
73. **Glacken MW, Fleischaker RJ and Sinskey AJ.** Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 28: 1376-1389, 1986.
74. **Glacken MW, Fleischaker RJ and Sinskey AJ.** Large-scale production of mammalian cells and their products: engineering principles and barriers to scale-up. *Ann N Y Acad Sci* 413: 355-372, 1983.
75. **Hu WS and Piret JM.** Mammalian cell culture processes. *Curr Opin Biotechnol* 3: 110-114, 1992.
76. **Garcia-Ochoa F and Gomez E.** Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv* 2008.

77. **Kara F, Gurakan GC and Sanin FD.** Monovalent cations and their influence on activated sludge floc chemistry, structure, and physical characteristics. *Biotechnol Bioeng* 100: 231-239, 2008.
78. **Amin AK, Huntley JS, Bush PG, Simpson AH and Hall AC.** Chondrocyte death in mechanically injured articular cartilage-the influence of extracellular calcium. *J Orthop Res* 2008.
79. **Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G and Freed LE.** Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* 63: 197-205, 1999.
80. **Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, Sterk LM, Geelkerken RH, Vermes I and Feijen J.** Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials* 27: 2390-2397, 2006.
81. **Lindqvist A, Dreja K, Sward K and Hellstrand P.** Effects of oxygen tension on energetics of cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H110-H117, 2002.
82. **Hogg N, Browning J, Howard T, Winterford C, Fitzpatrick D and Gobe G.** Apoptosis in vascular endothelial cells caused by serum deprivation, oxidative stress and transforming growth factor-beta. *Endothelium* 7: 35-49, 1999.

83. **Hellstrand P, Johansson B and Norberg K.** Mechanical, electrical, and biochemical effects of hypoxia and substrate removal on spontaneously active vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 100: 69-83, 1977.
84. **Paul RJ.** Chemical energetics of vascular smooth muscle. In: Bohr DF, Somlyo AP and Sparks HVJ. Vascular smooth muscle. American Physiology Society. Bethesda, MD. 1980. 201-235.
85. **Paul RJ, Krisanda JM and Lynch RM.** Vascular smooth muscle energetics. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2: S320-S327, 1984.
86. **Morrison ES, Scott RF, Kroms M and Frick J.** Glucose degradation in normal and atherosclerotic aortic intima-media. *Atherosclerosis* 16: 175-184, 1972.
87. **Odessey R and Chace KV.** Utilization of endogenous lipid, glycogen, and protein by rabbit aorta. *Am J Physiol* 243: H128-H132, 1982.
88. **Chace KV and Odessey R.** The utilization by rabbit aorta of carbohydrates, fatty acids, ketone bodies, and amino acids as substrates for energy production. *Circ Res* 48: 850-858, 1981.
89. **Gollub J, Cremo CR and Cooke R.** Phosphorylation regulates the ADP-induced rotation of the light chain domain of smooth muscle myosin. *Biochemistry* 38: 10107-10118, 1999.

90. **Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, Janocha AJ, Masri FA, Arroliga AC, Jennings C, Dweik RA, Tudor RM, Stuehr DJ and Erzurum SC.** Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1342-1347, 2007.
91. **Marshall NJ, Goodwin CJ and Holt SJ.** A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5: 69-84, 1995.
92. **Jones CI, III, Han Z, Presley T, Varadharaj S, Zweier JL, Ilangovan G and Alevriadou BR.** Endothelial cell respiration is affected by the oxygen tension during shear exposure: role of mitochondrial peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C180-C191, 2008.
93. **Lamm P, Juchem G, Milz S and Reichart B.** Continuous graft perfusion: optimizing the quality of saphenous vein grafts. *Heart Surg Forum* 5 Suppl 4: S355-S361, 2002.
94. **Harden TK, Su YF and Perkins JP.** Catecholamine-induced desensitization involves an uncoupling of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Res* 5: 99-106, 1979.
95. **Jacob G, Garland EM, Costa F, Stein CM, Xie HG, Robertson RM, Biaggioni I and Robertson D.** Beta2-adrenoceptor genotype and

function affect hemodynamic profile heterogeneity in postural tachycardia syndrome. *Hypertension* 47: 421-427, 2006.

96. **Hull SS, Jr., Kaiser L, Jaffe MD and Sparks HV, Jr.** Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels* 23: 183-198, 1986.
97. **Wechezak AR, Coan DE, Viggers RF and Sauvage LR.** Dextran increases survival of subconfluent endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Physiol* 264: H520-H525, 1993.
98. **Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T and Yoshida Y.** Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res* 86: 185-190, 2000.
99. **Clerin V, Gusic RJ, O'Brien J, Kirshbom PM, Myung RJ, Gaynor JW and Gooch KJ.** Mechanical environment, donor age, and presence of endothelium interact to modulate porcine artery viability ex vivo. *Ann Biomed Eng* 30: 1117-1127, 2002.
100. **Forman MB, Virmani R and Puett DW.** Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation* 81: IV69-IV78, 1990.
101. **Bhardwaj A, Harukuni I, Murphy SJ, Alkayed NJ, Crain BJ, Koehler RC, Hurn PD and Traystman RJ.** Hypertonic saline worsens infarct

volume after transient focal ischemia in rats. *Stroke* 31: 1694-1701, 2000.

102. **Olinger GN, Boerboom LE, Bonchek LI, Hutchinson LD and Kissebah AH.** Hyperkalemia in cardioplegic solutions causing increased cholesterol accumulation in vein grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 85: 590-594, 1983.
103. **Jakobsen O, Stenberg TA, Losvik O, Ekse S, Sorlie DG and Ytrebo LM.** Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution preserves endothelium-derived hyperpolarization factor-dependent vasodilation. *Eur J Cardiothorac Surg* 33: 18-24, 2008.
104. **He GW and Yang CQ.** Superiority of hyperpolarizing to depolarizing cardioplegia in protection of coronary endothelial function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114: 643-650, 1997.
105. **He GW.** Hyperkalemia exposure impairs EDHF-mediated endothelial function in the human coronary artery. *Ann Thorac Surg* 63: 84-87, 1997.
106. **Abbott A, Jr., Hill R, Shears L, Beamer K, Gustafson R and Murray G.** Effects of calcium chloride administration on the postischemic isolated rat heart. *Ann Thorac Surg* 51: 705-710, 1991.

107. **Jakobsen O, Muller S, Aarsaether E, Steensrud T and Sorlie DG.** Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution improves cardioprotection. *Eur J Cardiothorac Surg* 32: 493-500, 2007.
108. **He GW, Yang CQ, Rebeyka IM and Wilson GJ.** Effects of hyperkalemia on neonatal endothelium and smooth muscle. *J Heart Lung Transplant* 14: 92-101, 1995.
109. **Brezis M, Shina A, Kidroni G, Epstein FH and Rosen S.** Calcium and hypoxic injury in the renal medulla of the perfused rat kidney. *Kidney Int* 34: 186-194, 1988.
110. **Escudero BA, Arias FF, Patron Rodriguez RR, Garcia GR and Cuesta RC.** [Cryobiology and pathologic lesions induced by freezing-thawing processes in prostatic tissue. Second part]. *Arch Esp Urol* 57: 1073-1090, 2004.
111. **Zhang A, Xu LX, Sandison GA and Cheng S.** Morphological study of endothelial cells during freezing. *Phys Med Biol* 51: 6047-6060, 2006.
112. **Ando J, Komatsuda T, Ishikawa C and Kamiya A.** Fluid shear stress enhanced DNA synthesis in cultured endothelial cells during repair of mechanical denudation. *Biorheology* 27: 675-684, 1990.
113. **Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanawala A, Sanzgiri S and Langer R.**

Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J Vasc Surg* 33: 628-638, 2001.

114. **Porter KE, Nydahl S, Dunlop P, Varty K, Thrush AJ and London NJ.** The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia. *Cardiovasc Res* 31: 607-614, 1996.
115. **Vyalov S, Langille BL and Gotlieb AI.** Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *Am J Pathol* 149: 2107-2118, 1996.
116. **Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M and Zeiher AM.** Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399: 71-74, 1996.
117. **Kaiser D, Freyberg MA and Friedl P.** Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 586-590, 1997.
118. **Romanenko VG, Davies PF and Levitan I.** Dual effect of fluid shear stress on volume-regulated anion current in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C708-C718, 2002.
119. **Carnagey J, Hern-Anderson D, Ranieri J and Schmidt CE.** Rapid endothelialization of PhotoFix natural biomaterial vascular grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65: 171-179, 2003.

120. **Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J and Mayer JE, Jr.** Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7: 1035-1040, 2001.
121. **Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P and Becker BF.** The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res* 104: 1313-1317, 2009.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Überblick gesamte Perfusions-/Superfusionsanlage	4
Abbildung 2	Ein Kreislauf mit seinen Bestandteilen	5
Abbildung 3	Digitale Steuerungs- und Meßeinheit	7
Abbildung 4	Gasflussregulator 1-3 für Oxygenator 1-3	8
Abbildung 5	Aufnahmekonstruktion eines Kreislaufs für die angegebenen Bestandteile.....	9
Abbildung 6	Kulturmediumreservoir eines Kreislaufs mit Anschlussbezeichnungen	10
Abbildung 7	Oxygenator in seiner Aufhängung mit bezeichneten Anschlüssen...	11
Abbildung 8	Schlauchteil eines Anlagenkreislaufs mit Bezeichnung der Positionen der jeweiligen Kreislaufkomponenten und der Schlauchklemmen zur Einstellung einer Superfusion mit bzw. ohne Starling-Widerstand ...	13
Abbildung 9	Dämpferspritzen der Per- und Superfusion in der entsprechenden Halterung.....	14
Abbildung 10	Organzylinder mit Anschlussbezeichnungen.....	15
Abbildung 11	Gefäßmaterialeinbauvorrichtung	17
Abbildung 12	Starling-Widerstand mit Bezeichnung von Bestandteilen und Anschlüssen:	19
Abbildung 13	Drucksensoren der Per- und Superfusion eines Anlagenkreislaufs installiert auf der entsprechenden Montageplatte einer Aufnahmekonstruktion.....	20
Abbildung 14	Wärmetauscher der Super- und Perfusion mit Anschlussbezeichnungen; Warmwasseranschlüsse eines Anlagenkreislaufs..	22
Abbildung 15	Vorrichtung für die MTS-Reduktion der luminalen Oberfläche von Gefäßsegmenten.....	34

Abbildung 16	Dokumentation von physiologischen arteriellen Druckverhältnissen innerhalb eines Anlagenkreislaufes.....	39
Abbildung 17	maximale Gefäßkontraktion von Rindervenvenen induziert durch 150 mM KCl vor und nach Inkubation im Anlagenkreislauf unter den Bedingungen der jeweiligen Gruppe.....	41
Abbildung 18	Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenvenen vor und nach Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 1 im Anlagenkreislauf ...	42
Abbildung 19	Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenvenen vor und nach Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 2 im Anlagenkreislauf ...	42
Abbildung 20	Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenvenen vor und nach Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 3 im Anlagenkreislauf ...	43
Abbildung 21	Noradrenalin Dosis-Wirkungskurven der Rindervenvenen vor und nach Inkubation unter Bedingungen der Gruppe 1' im Anlagenkreislauf...	43
Abbildung 22	Verhalten der Rindervenvenenkontraktionskraft (Gruppe 1, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	45
Abbildung 23	Verhalten der Rindervenvenenkontraktionskraft (Gruppe 2, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	45
Abbildung 24	Verhalten der Rindervenvenenkontraktionskraft (Gruppe 3, vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	46
Abbildung 25	Verhalten der Rindervenvenenkontraktionskraft (Gruppe 1', vor Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	46
Abbildung 26	Verhalten der Rindervenvenenkontraktionskraft (Gruppe 1, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	47

Abbildung 27	Verhalten der Rindervenekontraktionskraft (Gruppe 2, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	47
Abbildung 28	Verhalten der Rindervenekontraktionskraft (Gruppe 3, nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	48
Abbildung 29	Verhalten der Rindervenekontraktionskraft (Gruppe 1', nach Inkubation) nach NE bedingter Kontraktion mit und ohne Zugabe steigender Konzentrationen Acetylcholin.....	48
Abbildung 30	Reaktion von durch NE auf 80 % der maxiamlen Kraft kontrahierten Rindervenen der Gruppe 1 auf steigende Konzentrationen Acetylcholin (Angabe als Logarithmus) und anschließende SNP-Gabe	49
Abbildung 31	Sauerstoffpartialdrücke des Perfusionsflusses im jeweiligen Rindervenen-Inkubationsmilieu über die Zeit gemessen auf der Ausflusseite des Organzylinders.....	51
Abbildung 32	Kohlenstoffdioxidpartialdrücke des Perfusionsflusses im jeweiligen Rindervenen-Inkubationsmilieu über die Zeit gemessen auf der Ausflusseite des Organzylinders.....	51
Abbildung 33	Sauerstoffpartialdruckdifferenz zwischen Organzylindereinlass und – auslass des Perfusionsflusses über die Inkubationszeit der jeweiligen Rindervenengruppe	52
Abbildung 34	Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 1+1' nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade	53
Abbildung 35	Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 2 nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade	53
Abbildung 36	Unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 3 nach Punkt 4.2.5.4 errechnete kumulative D-Glukose- und Laktatwerte mit jeweiliger Regressionsgerade	54

Abbildung 37	pH-Werte des Perfusionsflusses im jeweiligen Rinderven- Inkubationsmilieu über die Inkubationszeit.....	55
Abbildung 38	Verhalten der Natriumkonzentration im jeweiligen Rinderveninkubationsmilieu über die Inkubationszeit.....	56
Abbildung 39	Verhalten der Kaliumkonzentration im jeweiligen Rinderveninkubationsmilieu über die Inkubationszeit.....	57
Abbildung 40	Verhalten der Kalziumkonzentration im jeweiligen Rinderveninkubationsmilieu über die Inkubationszeit.....	58
Abbildung 41	Verhalten der Chloridkonzentration im jeweiligen Rinderveninkubationsmilieu über die Inkubationszeit.....	59
Abbildung 42	kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 1+1' über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade.	60
Abbildung 43	kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 2 über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade	61
Abbildung 44	kumulative Elektrolytkonzentrationen unter Inkubationsbedingungen der Rindervenengruppe 3 über die Inkubationszeit relativ im Verhältnis zu Tag 0 (=100 %) mit jeweiliger Regressionsgerade.	61
Abbildung 45	Mikroskopische Abbildung von mittels HE und TUNEL gefärbten Rindervenenschnitten vor und nach Inkubation unter den Bedingungen der jeweiligen Gruppe.....	63

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mittels Datenakquisitionsoftware digital erfassbare, visuell präsentierbare und speicherbare Messwerte	6
Tabelle 2	Digitale Prozesssteuerung der Schlaupumpen.....	6
Tabelle 3	Beispiele für das gegenseitige Abhängigkeitsverhältniss von Puls- und Flussrate der Perfusion (Werte von FMI bestimmt)	8
Tabelle 4	verfügbare Gefäßpräparatanschlussrohre.....	16
Tabelle 5	Zur Anlagentemperierung verwendete Thermostaten und deren Versorgungsbereiche	21
Tabelle 6	Zur Vorbereitung eines Anlagenkreislaufs benötigte Komponenten und deren Sterilisationsart.....	23
Tabelle 7	Vorbereitung eines Oxygenators vor Integration in einen Anlagenkreislauf.....	24
Tabelle 8	Für den Einbau von Gefäßmaterial in einen Anlagenkreislauf benötigte (sterile) Materialien	26
Tabelle 9	Eigenschaften der unterschiedlichen untersuchten Versuchsmilieus und Anzahl der dem jeweiligen Milieu ausgesetzten Rindervenens... ..	29
Tabelle 10	Für die Rindervenenspräparation verwendete Materialien.....	31
Tabelle 11	Durchführung des MTS-Reduktions Tests.....	34
Tabelle 12	Hematoxylin/Eosin-Mehrfachfärbung (HE-Färbung).....	35
Tabelle 13	Zeitpunkte der Nährmediumprobenentnahmen an Zufluss und Ausfluss des Organzylinders während der Rindervenensinkubation..	35
Tabelle 14	dekadischen Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration [$\log(\text{EC}_{50})$] von Noradrenalin bei Rindervenens vor und nach Inkubation unter den Bedingungen der jeweiligen Gruppe	44
Tabelle 15	OD_{430} der MTS-Reduktion durch die luminale Oberfläche der Rindervenens der jeweiligen Gruppe vor und nach Inkubation	49

Tabelle 16	Steigung und in Klammern der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden der nach Punkt 4.2.5.4 errechneten kumulativen D-Glukose- und Laktatwerte des jeweiligen Rinderveneningubationsmilieus.....	54
Tabelle 17	relative Elektrolytkonzentrationsänderung pro Tag entsprechend der Regressionsgeradensteigung der nach Punkt 4.2.5.4 umgerechneten absoluten Elektrolytkonzentrationen des jeweiligen Rinderveneningubationsmilieus.....	62

Danksagung

Zum Schluss meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D.E. Birnbaum, ehemaliger Chefarzt der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg, für die Überlassung dieses interessanten Themas und des Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr. C. Schmid, Nachfolger von Herrn Prof. Dr. D.E. Birnbaum, für die weitere Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. M. Hönicka für die jederzeit gewährte, großzügige Unterstützung und Beratung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke auch K. Bielenberg und S. Bergmann für die hervorragende Mitarbeit bei der Durchführung und Auswertung dieser Untersuchungen, Herrn Dr. Ing. S. Moravec, Hochschule für angewandte Wissenschaften FH München, für die Messungen der Nährmediumviskosität.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ludwig Wiedemann
Geburtsdatum	24.09.1980
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1987 – 2000	Grundschule und Gymnasium in Landshut
-------------	---------------------------------------

Ersatzdienst

2000 – 2001	Herzkatheterlabor des Krankenhauses Landshut-Achdorf
-------------	---

Hochschulausbildung

2001 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2007	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

Seit 2008	Assistenzarzt für innere Medizin in der medizinischen Klinik II des Klinikums Landshut
-----------	---