

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**In-vitro Vergleich von zellbesiedelten und konditionierten neu
entwickelten Polyurethanaortenklappenprothesen und Homografts**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kay Nikolaus Florian Thierfelder

aus

Bad Säckingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Priv. Doz. Dr. med. Erich Kilger

Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr.-Ing. Bassil Akra

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	KURZZUSAMMENFASSUNG	5
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3	EINLEITUNG	8
4	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	10
4.1	Anatomie des Herzens	10
4.2	Herzklappen	11
4.2.1	Anatomie und Funktion	11
4.2.2	Herzklappenerkrankungen	13
4.2.3	Therapie von Herzklappenerkrankungen	15
4.3	Tissue Engineering	18
4.3.1	Hintergrund	18
4.3.2	Bioreaktoren	20
4.3.3	Tissue Engineering von Herzklappen	22
5	METHODEN	25
5.1	Zellisolation und Zellkultivierung	25
5.1.1	Zellisolation	25
5.1.2	Zellkultivierung	27
5.1.3	Kryokonservierung	28
5.2	Zellbesiedelung und Konditionierung	29
5.2.1	Herstellung der Polyurethanherzklappen	29
5.2.2	Vorbereitung der Herzklappen	30
5.2.3	Zellbesiedelung	32
5.2.4	Zellkonditionierung	34
6	ANALYSE	40
6.1	Rasterelektronenmikroskopie	40
6.1.1	Allgemeines	40
6.1.2	Fixierung	41
6.1.3	Alkoholreihe	41
6.1.4	Kritisch-Punkt-Trocknen	42
6.1.5	Sputtern	42
6.1.6	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	42
6.2	Immunhistochemie	43
6.2.1	Allgemeines	43
6.2.2	Probengewinnung	43
6.2.3	Zellkultur	43
6.2.4	Paraffinschnitte	44

6.2.5	Färbung	44
6.3	Quantitative rt-PCR	46
6.3.1	Allgemeines	46
6.3.2	Probengewinnung und Lagerung	48
6.3.3	RNA-Isolierung	48
6.3.4	Reverse Transkription	48
6.3.5	rt-PCR	49
6.3.6	Schmelzkurve	50
6.3.7	Gel-Elektrophorese	50
7	ERGEBNISSE	51
7.1	Rasterelektronenmikroskopie	51
7.1.1	Nativgewebe	51
7.1.2	Zellbesiedelung	53
7.1.3	Zellkonditionierung	55
7.1.4	Tabellarische Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse	57
7.2	Immunhistochemische Analyse	58
7.2.1	Zellkulturen	58
7.2.2	Nativproben der Homografts	58
7.2.3	Zellbeschichtungsnachweis	59
7.2.4	Nachweis der extrazellulären Matrix	61
7.2.5	Interzelluläre Verbindungen	63
7.2.6	Immunmodulatorische Zellreaktion	65
7.2.7	Tabellarische Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse	67
7.3	PCR	68
7.3.1	Effekt der 1. Konditionierungsphase	68
7.3.2	Effekt der EC-Besiedelung auf die Genexpression	70
7.3.3	Effekt der 2. Konditionierungsphase	72
7.3.4	Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse	74
8	DISKUSSION	75
9	ZUSAMMENFASSUNG	80
10	LITERATURVERZEICHNIS	83
11	ANHANG	95
	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	114
	DANKSAGUNG	145

1 Kurzzusammenfassung

Zielsetzung: Neue Entwicklungen und Ansätze im Forschungsbereich Tissue Engineering treiben die Weiterführung bestehender Forschung und Neuentwicklung von Herzklappenimplantate voran. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zellbesiedelte synthetische und biologische Trägermaterialien nach einer Konditionierungsphase verglichen.

Material und Methoden: In einem enzymatischen Verfahren wurden Endothelzellen (EC) und Fibroblasten (FB) aus Vena saphena magna-Segmenten isoliert und anschließend kultiviert. Die synthetischen (Gruppe A; n=4) und die biologischen (Kontrollgruppe B; n=4) Trägermaterialien konnten zunächst mit FB ($92.11 \pm 11.08 \times 10^6$ Zellen) und später mit EC ($96.48 \pm 8.05 \times 10^6$ Zellen) beschichtet werden. Jeder Zellbeschichtung folgte eine fünftägige Konditionierungsphase (750-1100 ml/min). Vor und nach jeder Konditionierungsphase fand eine Probenentnahme statt. Die Analyse erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskop (REM), immunhistochemischer Färbungen (IHC) und echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR).

Ergebnisse: Die REM-Auswertung konnte sowohl nach der Zellbeschichtung als auch nach den Konditionierungsphasen in beiden Gruppen die aufgetragenen Zellschichten darstellen. Bestätigend zeigten die EC- (CD31) und FB-Antikörper (TE-7) sowohl vor als auch nach der Konditionierungsphase positive Reaktionen. Der Aufbau einer extrazellulären Matrix (EZM) während der Konditionierung konnte mittels Antikörpern gegen Collagen IV und Fibronectin nachgewiesen werden. Eine stärkere Ausprägung der EZM konnte auf der flusszugewandten Innenseite beobachtet werden. Die PCR-Ergebnisse zeigten ein ähnliches pro-inflammatorisches Bild in beiden Versuchsgruppen.

Zusammenfassung: Die Eignung des Bioreaktors zur Zellkonditionierung zeigte sich am flussabhängigen Aufbau einer EZM. Gute Zellbesiedelbarkeit und äquivalente pro-inflammatorische Reaktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe bewiesen das Potential

des synthetischen Gerüsts für das Tissue Engineering von Herzklappen. Der Einsatz als Herzklappenersatz sollte weiterhin als Ziel verfolgt werden.

2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AC	nach Konditionierung
AK	Antikörper
aliq.	aliquotiert
BC	vor Konditionierung
CK	Chemokin
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³ = ml	Milliliter
DEPC	Diethyl Pyrocarborat
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblasten
FBS	Fötales Kälberserum
Fl.	Flasche
g	Gramm
h	Stunde
HO	Homograft
I.E.	Internationale Einheiten
IHC	Immunhistochemie
L	Liter
mA	Milliampere
TE	Tissue Engineering

Abkürzung	Bedeutung
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
n.d.	Nicht durchgeführt
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	real-time polymerase chain reaction
tg/hg	target gene / housekeeping gene
U / min	Umdrehungen pro min
V	Volt
ZK	Zytokin
ng	Nanogramm
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

3 Einleitung

Die auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurück zu führenden Todesfälle machen in der Welt bereits über 30 % aus. Die daraus resultierende Anzahl an Todesfällen wird, alleine durch die Weltbevölkerungsentwicklung, in den kommenden 40 Jahren massiv zunehmen. Ein erheblicher Anteil dieser Erkrankungen ist direkt, beziehungsweise indirekt mit Herzklappendefekten assoziiert. Diese haben ihren Ursprung zum einen im Lebensstil der Industrienationen, zum anderen aber auch in rheumatischer Genese, überwiegend begünstigt durch unzureichende medizinische Versorgung in Entwicklungs- und Schwellenländern. Daraus folgend steht man gerade am Anfang der Herausforderung, den massiv wachsenden Bedarf an Behandlungen pathologisch veränderter Herzklappen zu decken. [1-6]

In den meisten Fällen wird diese Behandlung wohl auch in Zukunft durch den Ersatz der erkrankten Herzklappe durchgeführt werden. Betrachtet man jedoch beide heute auf dem Markt befindlichen Prothesenarten, so fällt auf, dass sowohl mechanische als auch biologische Herzklappen mit zum Teil nicht unerheblichen Nachteilen behaftet sind.

Mechanische Herzklappen haben den Vorteil einer extrem langen Lebensdauer, erzwingen aber gleichzeitig die Durchführung einer lebenslangen gerinnungshemmenden Therapie, welche mit möglichen Blutungskomplikationen einhergeht. Insbesondere stellt dies bei schlechtem „Blutgerinnungs-Monitoring“ in Entwicklungs- und Schwellenländern ein großes Problem dar.

Diesen Nachteil findet man beim Einsatz von biologischen Herzklappen nicht. Sie sind allerdings in ihrer Lebensdauer beschränkt und können so unter Umständen weitere Operationen nach sich ziehen. Neben den offensichtlichen Einschränkungen und Risiken für den einzelnen Patienten ergeben sich zusätzlich nicht unerhebliche Folgekosten bei einer lebenslangen antikoagulatorischen Therapie, beziehungsweise einer oder mehreren Re-Operationen. [7-12]

Diese Problematik bei den bisherigen Therapieoptionen versucht man nun durch die Entwicklung von Herzklappenprothesen mittels Tissue-Engineering (TE) zu umgehen. Der Gedanke hinter TE ist, durch eine Kombination von Trägermaterial und Zellen zerstörtes Gewebe beziehungsweise erkrankte Organe zu imitieren und zu ersetzen. Dabei können als Trägermaterial entweder synthetische oder biologische Werkstoffe

verwendet werden. Die zusätzlich benötigten Zellen lassen sich sowohl autolog (Spender ist auch Empfänger) als auch homolog (Spender und Empfänger entstammen der gleichen Spezies) aus den unterschiedlichsten Geweben gewinnen und kultivieren. Um die TE-Implantate *in vitro* an die physiologischen *in-vivo*-Belastungen zu gewöhnen, werden vielfach sogenannte Bioreaktoren eingesetzt. Dabei werden sie gewebetypischen Reizen und/oder Stimuli exponiert. Bei der Entwicklung einer Herzklappenprothese müssen in einem Bioreaktor deshalb nicht nur adäquate Bedingungen zur Zellproliferation geschaffen, sondern auch ein möglichst physiologischer Blutfluss simuliert werden. Eine unter Berücksichtigung all dieser Faktoren hergestellte Herzklappenprothese würde also im besten Fall die positiven Eigenschaften bisheriger Prothesen kombinieren und ihrem menschlichen Original bereits vor einer Implantation möglichst nahe kommen. [13-17]

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte sich noch keine bestimmte Kombination aus Trägermaterial und Zellen zur Herstellung einer neuen Herzklappenprothese besonders empfehlen. Aufgrund dieser Tatsache sollen im Rahmen dieser Dissertation jeweils eine Kombination aus venösen Zellen mit einem synthetischen bzw. einem biologischen Zellträger genauer untersucht und gegenüber gestellt werden. Zum Einsatz kommen neu entwickelte Polyurethangerüste und Homografts. Die Zellbeschichtung wird in zwei Schritten mit Fibroblasten und mit Endothelzellen realisiert. Zur Etablierung physiologischer Bedingungen während der Versuche wird ein Bioreaktor eingesetzt, der im Rahmen einer Kooperation mit der TU München entwickelt wurde. [18-22]

Im Rahmen der Versuchsevaluation wird zunächst die Zellbesiedelbarkeit der Materialien sowie ihr Einfluss auf das Zellverhalten, insbesondere auf die pro-inflammatorische Reaktion der Zellen, untersucht. Des Weiteren soll die Wirkung des Bioreaktors sowohl auf die Zellen, als auch die Effektivität der Konditionierung beschrieben werden. Der Nachweis der Bildung einer extrazellulären Matrix würde die Konditionierungsabhängigkeit untermauern. Die resultierenden Ergebnisse sollen anschließend erörtert und gegebenenfalls mögliche Verbesserungen in Versuchsaufbau und/oder -ablauf angestrebt werden.

4 Theoretische Grundlagen

4.1 Anatomie des Herzens

Das menschliche Herz ist in der Brusthöhle lokalisiert. Im Mediastinum, dem Ort zwischen den beiden Lungenhälften, liegt es in der unteren Hälfte im sogenannten Herzbeutel. Auf die Körperoberfläche projiziert, reichen die Herzumrisse so von der zweiten bis zur fünften Rippe, gehen rechts etwa ein bis zwei Zentimeter über das Brustbein hinaus und ragen auf der linken Seite etwa bis in die Mitte des Schlüsselbeins (Medioklavikularlinie). Der herzumschließende Beutel besteht aus Perikard, einer dünnen bindegewebigen Haut und ist basal mit dem Zwerchfell (Diaphragma) verwachsen. An den Austrittsstellen der großen Gefäße geht das Perikard in das dem Herzen direkt aufliegende Epikard über. Durch ein geringes Volumen an seröser Flüssigkeit im Herzbeutel (10-15 ml) können die beiden Häute (Peri- und Epikard) während der Herzbewegung leicht übereinander gleiten.

Das Herz besteht zum größten Teil aus Muskelgewebe, dem Myokard, einem geringen Anteil Bindegewebe sowie einer variierenden Menge an aufliegendem Fettgewebe. Bei einem erwachsenen gesunden Mann ist es durchschnittlich 300-350 g schwer und etwas mehr als faustgroß. Durch den Herzaufbau werden vier Hohlräume, die sogenannten Herzkammern, geformt. Die zwei dünnwandigen „oben“ gelegenen Herzkammern werden als Vorhöfe (Atrien), die zwei muskulösen, dickwandigen basal gelegenen als Ventrikel bezeichnet. Jeweils ein Vorhof und ein Ventrikel werden als linke, beziehungsweise rechte (topografisch gesehen) Herzhälfte zusammengefasst und durch das Herzseptum getrennt. In jeder Herzhälfte sind Vorhof und Ventrikel durch eine Segelklappe getrennt, welche den Blutfluss nur in Richtung Ventrikel zulässt. Eine weitere Herzklappe findet man am jeweiligen Übergang von Ventrikel und angeschlossener Arterie, welche wiederum nur einen Fluss aus dem Ventrikel hinaus ermöglicht.

Physiologisch unterscheidet man das arterielle Hochdrucksystem, welches von der linken Herzhälfte aus den Körperkreislauf mit Blut versorgt, sowie das arterielle Niederdrucksystem, welches von der rechten Herzhälfte angetrieben die Lunge mit Blut perfundiert. Durch den venösen Rückfluss aus der Lunge in den linken Vorhof und den Blutrückstrom durch die obere und die untere Hohlvene aus dem Körper in den rechten

Vorhof besteht so ein geschlossener Kreislauf. Bei einem durchschnittlichen Schlagvolumen von 70-80 cm³ Blut ergibt sich in Ruhe (physiologischer Ruhepuls: 65 Schläge / min) ein durchschnittliches Herzminutenvolumen von ca. 5 Litern. [23-28]

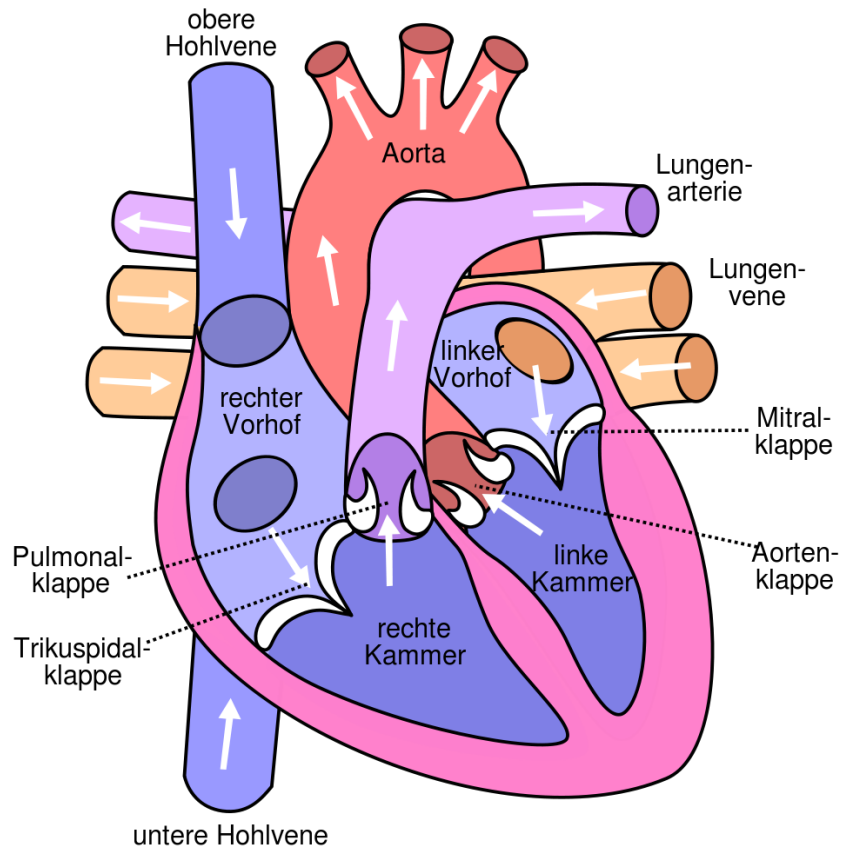


Abbildung 4-1; Schematische Darstellung des menschlichen Herzens mit angeschlossenen Gefäßen. Die Flussrichtung des Blutes ist anhand der weißen Pfeile verdeutlicht.

Quelle: Wikipedia.org

4.2 Herzklappen

4.2.1 Anatomie und Funktion

Die vier Klappen des Herzens lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Zum einen die zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln verankerten Segelklappen, des weiteren die Taschenklappen zwischen dem Ausflusstrakt der Ventrikel und den Arterien. Alle vier Klappen des Herzens liegen auf einer Ebene, welche als Klappenebene bezeichnet wird. Die Bezeichnung „Segelklappen“ geht auf den Aufbau der Mitralklappe bzw. Trikuspidalklappe zurück. Sie bestehen aus zwei (Mitralklappe), respektive drei (Trikuspidalklappe)

segelförmigen, von Endothel überzogenen Bindegewebsblättern. Aufgehängt sind sie am Klappenring in der Klappenebene am atrioventrikulären Übergang, und die freien Segelenden werden durch den Papillarmuskel Richtung Herzspitze gezogen. In der Systole (Phase der Herzmuskelkontraktion) werden die Segel durch den Muskel gespannt und lagern sich aneinander an, womit der Blutrückfluss in die Vorhöfe verhindert wird.

Die Aortenklappe und die Pulmonalklappe hingegen bestehen aus drei bauchigen Taschen, worauf die gemeinsame Bezeichnung „Taschenklappen“ zurück zu führen ist. Sie verhindern während der Diastole (Erschlaffungsphase des Herzmuskels) den Rückstrom des Blutes aus der Aorta und der Pulmonalarterie in die jeweiligen Ventrikel. Durch die Kontraktion des Herzmuskels verringert sich das Volumen der Ventrikel, was zum Auswurf des Blutes führt. Aufgrund der Anordnung und der Ventilfunktion der Herzklappen ist dies jedoch nur durch die Taschenklappen in die großen Arterien möglich. In der darauf folgenden Entspannungsphase des Herzmuskels kann nun wieder das Blut aus den Vorhöfen durch die Segelklappen in den Ventrikel gelangen. Während dieser Füllungsphase kann durch die Kontraktion der Vorhöfe zusätzlich bis zu 20 % des Schlagvolumens aktiv in den Ventrikel gepumpt werden. Durch diesen sich wiederholenden Arbeitskreislauf von An- und Entspannung des Herzmuskels kommt es zu einem gerichteten, pulsatilen Blutfluss. [24-26, 29, 30]

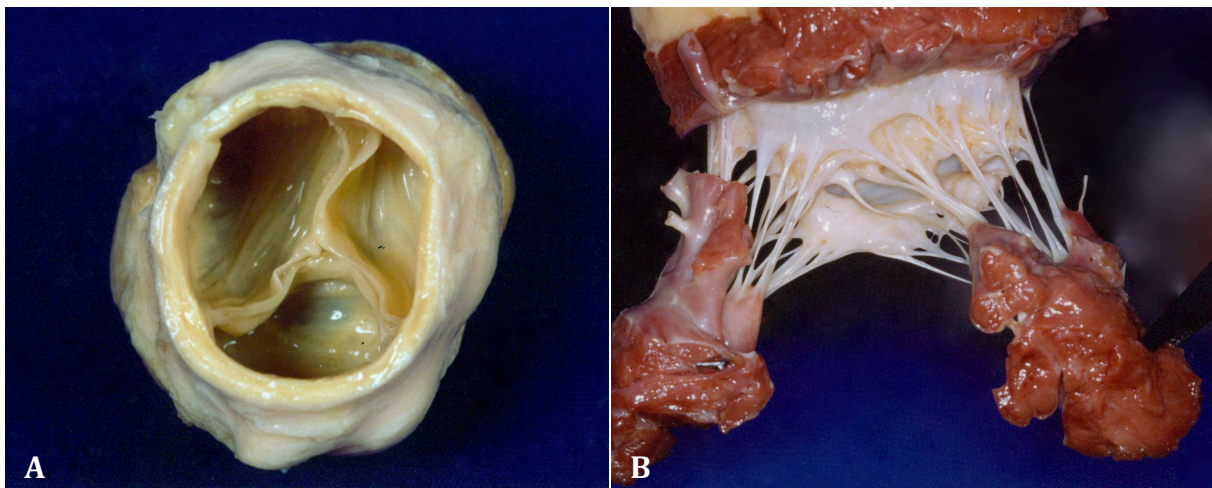


Abbildung 4-2; Darstellung der beiden Herzklappentypen: A: Taschenklappe am Beispiel einer Aortenklappe (Aufsicht), die Koaptation der 3 taschenförmigen Segel ist sternförmig zu erkennen; B: Segelklappe am Beispiel einer Mitralklappe (Seitenansicht), die beiden Segel sind mit anhängendem Pappilarmuskel präpariert.

4.2.2 Herzklappenerkrankungen

Herzklappenerkrankungen lassen sich zunächst in zwei große Gruppen einteilen: erstens die angeborenen und zweitens die im Laufe des Lebens erworbenen Herzklappenfehler. Den weitaus größeren Teil der Erkrankungen machen dabei die erworbenen Herzklappenfehler aus. Diese lassen sich nun wiederum in zwei Gruppen unterteilen, die Stenosen und die Insuffizienzen.

Stenosen:

Stenosierte Herzklappen sind nicht mehr in der Lage, sich adäquat zu öffnen. Sie weisen einen verminderten Querschnitt, den das Blut durchströmen muss, auf: die Klappenöffnungsfläche (Normale Öffnungsfläche der Aortenklappe: 2-4 cm²).

Dies hat zur Folge, dass beispielsweise bei einer vorliegenden Aortenstenose zum Aufbau eines adäquaten systolischen Blutdrucks prävalvulär eine vielfach höhere Kraft/höherer Druck aufgewendet werden muss (Dem Gesetz von Bernoulli folgend). Die damit verbundene massive Arbeitsbelastung des Herzmuskels führt im unbehandelten Fall zu einer hypertrophen Herzerkrankung.

Im Falle einer Mitral- bzw. Trikuspidalstenose kommt es im Gegensatz dazu zu einem Rückstau des Blutes „vor dem Herzen“. In der Lungenstrombahn kann dieser zu einem Lungenödem und einer damit verbundenen Dyspnoe, im Körperkreislauf zu Ödemen, Aszites und Hepatomegalie führen.

Ursachen für Stenosen sind meist entzündliche Reaktionen, ähnlich dem Ablauf der Arteriosklerose, die zu Kalzifizierungen, Verklebungen und zur Degeneration der Segel und des umliegenden Gewebes führen können. Als ein Risikofaktor gilt auch hier, analog zur arteriosklerotischen Gefäßerkrankung, eine genetische Disposition. In der bildgebenden Diagnostik stellen sich vor allem inhomogene Kalzifikationen im Klappenbereich und eine eingeschränkte Segelbewegung dar. Bei Herzkatheteruntersuchungen können deutliche Druckdifferenzen (prä- zu postvalvulär) gemessen werden. In Dopplermessungen können massive Flussgeschwindigkeitsanstiege an der Engstelle in Form eines systolischen „Jets“ nachgewiesen werden. [31-37]

Insuffizienzen:

Bei einer insuffizienten Herzklappe sind die Segel einer Herzklappe nicht mehr in der Lage, sich komplett zu schließen und damit den Rückfluss von Blut zu verhindern. Dies lässt sich auf die Schrumpfung, die Versteifung oder das Ausfransen der Segel zurückführen. Meist gehen mehrere dieser pathologischen Veränderungen gemeinsam einher. Die Ursache hierfür sind sehr häufig bakterielle Endokarditiden, aber auch rheumatische Erkrankungen können zu einer Insuffizienz führen. In einigen Fällen kann auch der Prolaps einer Herzklappe letztendlich die Insuffizienz dieser zur Folge haben. Aufgrund der Ineffektivität der Pumpleistung des Herzmuskels wirken sich Insuffizienzen genau wie Stenosen massiv arbeitsbelastend auf das Myokard aus, was unbehandelt auch hier zu einer hypertrophen Herzerkrankung führt. Bei Mitral- und Trikuspidalinsuffizienzen hat der Blutrückfluss zudem die gleichen klinischen Konsequenzen wie bei der Blutstauung dieser Klappen durch Stenosen, welche beispielweise mit (Lungen-) Ödemen und Hepatomegalien assoziiert sind. In der Diagnostik werden Insuffizienzen fast ausschließlich auskultatorisch und mittels Doppler-Echokardiographie nachgewiesen. Sie können aber beispielsweise auch im Herzkatheter durch einen Kontrastmittelrückfluss dargestellt werden. [5, 38-40]

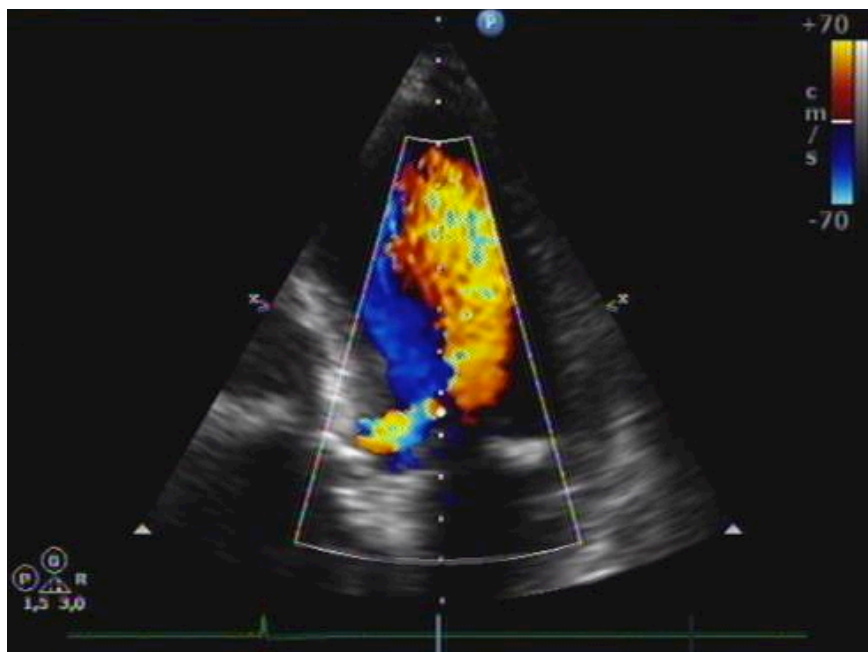


Abbildung 4-3; Beispiel einer hochgradigen Aortenklappeninsuffizienz, durch eine Doppler-Echokardiographie aufgenommen. Der große gelbe Bereich stellt den Rückfluss des Blutes durch die insuffiziente Klappe dar.

4.2.3 Therapie von Herzklappenerkrankungen

Sobald eine Herzklappenerkrankung symptomatisch wird oder diagnostisch einen gewissen Schweregrad erreicht hat, ist eine Therapie unausweichlich. Beispielsweise gelten bei einer Aortenklappenstenose aktuell die diagnostischen Richtwerte einer Klappenöffnungsfläche $<1.0 \text{ cm}^2$ bzw. eine Jetgeschwindigkeit $>4 \text{ m/sec}$. Bei der Therapie muss in fast allen Fällen operativ vorgegangen werden. Unter bestimmten Bedingungen können Aortenklappenprothesen inzwischen aber auch minimalinvasiv über die Herzspitze oder eine Arterie mit Hilfe eines Katheters implantiert werden. Dies bezeichnet man als TAVI-Verfahren (engl.: transcatheter aortic valve implantation). [8, 41-45]

Bei der operativen Therapie versucht man zunächst, ein herzklappenerhaltendes bzw. ein rekonstruktives Vorgehen durch zu führen. Sollte dies nicht gelingen, greifen die Chirurgen auf verschiedene Herzklappenprothesen zurück. Diese lassen sich in zwei Kategorien einteilen, in mechanische sowie biologische (Xenografts und Homografts) Herzklappen. [46, 47]

Mechanische Herzklappen

Die Implantation einer mechanischen Herzklappe wurde erstmals 1952 von Charles A. Hufnagel in Washington D.C. durchgeführt. Diese, von der Bauart her als Kugelventil einzuordnende Klappe wurde damals im Bereich der Aorta descendens implantiert und fungierte nur als unterstützendes Ventil zur kongenitalen Aortenklappe. Die erste künstliche Herzklappe, die wirklich den Ersatz einer erkrankten Herzklappe darstellte, wurde im Jahr 1960 von Dwight Harken in subkoronarer Position eingesetzt. Im gleichen Jahr konnten Albert Starr und Lowell Edwards eine Kugelprothese in der Pulmonalklappenposition implantieren. Es folgten im weiteren Verlauf die Entwicklung und der Einsatz von Kippscheiben- (1968) und Zweiflügelprothesen (1977) sowie anderen Designs. Bei der Konzeption der oben genannten Herzklappen griff man meist auf einen metallischen Korpus zurück. Mit Hilfe einer daran angebrachten Kunststoffmanschette konnte die Prothese später an ihrem Einsatzort festgenäht werden. Der bewegliche Teil der Klappe wurde je nach Prothesenart aus unterschiedlichen Werkstoffen hergestellt. Der Ball einer Kugelprothese bestand beispielsweise anfangs aus Metall, welches jedoch eine starke Hämolyse mit sich brachte und wurde so später durch einen „röntgenpositiven“ Gummiball ersetzt. Die

Kippscheiben und die Plättchen einer Flügelprothese konnten aufgrund ihrer geringeren Masse sowohl aus Metall als auch aus Karbon hergestellt werden. Allen künstlichen Prothesen gemein ist ein beim Klappenschluss durch den Aufprall der beweglichen Komponente(n) auf den Klappenkorpus verursachtes auskultatorisch deutlich hörbares Geräusch, der sogenannte Prothesenklick. [48-52]

Aufgrund der Herstellung aus den oben genannten Werkstoffen besitzen alle mechanischen Herzklappen den Nachteil einer thrombogenen Oberfläche. So müssen sich Prothesenempfänger zur Thrombenprophylaxe einer lebenslangen Antikoagulationstherapie unterziehen. Aktuell dienen hierfür sogenannte Cumarinderivate, beispielsweise Marcumar. Der entscheidende Vorteil mechanischer Prothesen besteht jedoch in ihrer sehr langen Lebensdauer, welche nur sehr selten Re-Operationen nötig werden lässt. Aufgrund der Risikoabwägung zwischen einer Cumarintherapie und wiederholten Herzklappenoperationen bei nicht-mechanischen Klappen wird aktuell vor allem bei jungen Patienten der Einsatz mechanischer Prothesen durchgeführt. [7, 10, 53]

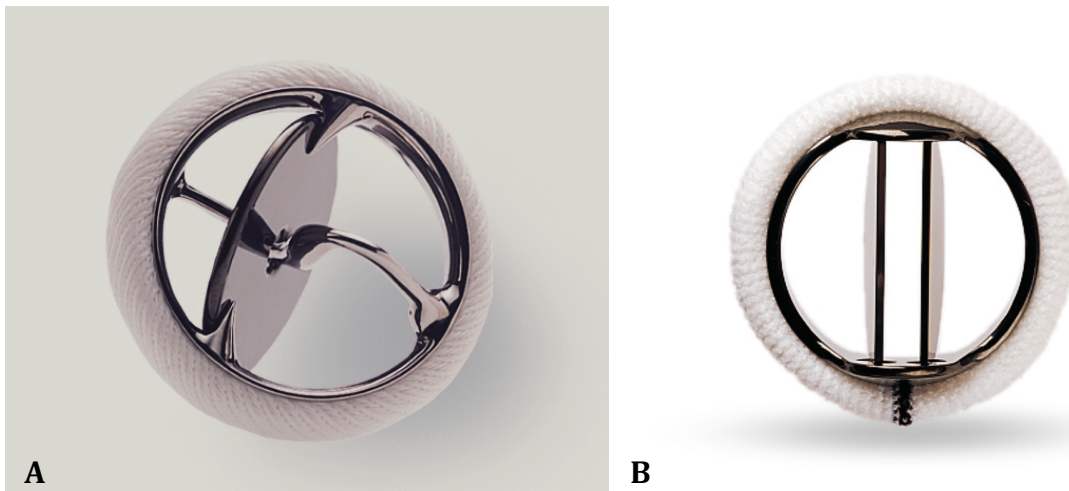


Abbildung 4-4; A: Mechanische Kippscheibenprothese; B: Mechanische Zweiflügelprothese.

Quelle: BVMed-Bilderpool

Biologische Herzklappen

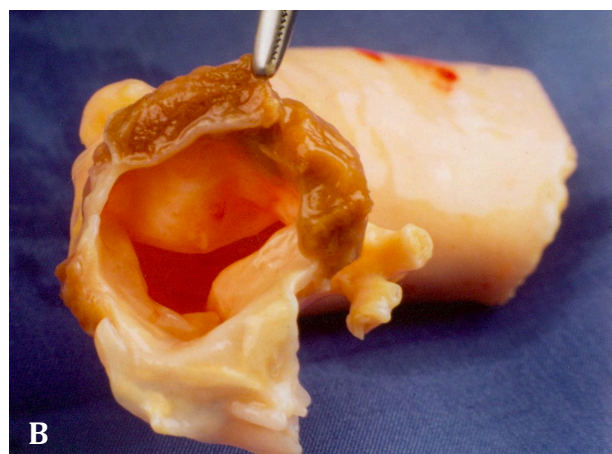
Erst über 10 Jahre nach der Implantation der mechanischen Prothese von Hufnagel wurde erstmals eine biologische Herzklappe verwendet. Im Jahr 1962 führte Raymond Heimbecker den ersten Mitralklappenersatz mittels eines Homografts durch. Ross und Barratt-Boyes konnten unabhängig von einander im gleichen Jahr fast zeitgleich durch

ein Homograft eine Aortenklappe ersetzen. 1967 wurde von Ross dann erstmals die Technik des autologen Ersatzes einer Aortenklappe durch die Pulmonalklappe beschrieben. Der erste Einsatz eines Xenografts als Herzklappenersatz konnte 1964 von Binet durchgeführt werden. Hierbei verwendete er die Aortenklappe eines Schweines. Bei allen der oben genannten Therapien wurden die transplantierten Prothesen unverändert und als ganzes verwendet. In der weiteren Entwicklung kamen später aber auch „zusammengesetzte“ Prothesen auf den Markt. Bei diesen wurden die Segel beispielsweise aus Schweineperikard gefertigt und in einen Kunststoffring eingenäht, mit welchem die Prothese im Herzen verankert wurde. Bei der Aufbereitung der biologischen Materialien werden antibiotische und fixierende Lösungen verwendet. Zur Fixierung verwendet man unter anderem Glutaraldehyd, welches inzwischen im Verdacht steht, zur schnelleren Degeneration und Kalzifikation der Klappen zu führen. [54-59]

Aufgrund ihrer thrombotisch inerten Oberfläche besteht bei biologischen, im Gegensatz zu mechanischen Herzklappenprothesen nicht die Indikation zu einer lebenslangen Antikoagulationstherapie. Ein großer Nachteil liegt jedoch in der limitierten Lebensdauer von durchschnittlich 10-20 Jahren, welcher relativ häufig re-Operationen indiziert. So wird durch die Risikoabwägung zur antikoagulativen Therapie mechanischer Herzklappen die Implantation biologischer Prothesen bei Patienten meist erst ab einem Alter von 60 bis 65 Jahren durchgeführt. In Fällen, in denen keine lebenslange Antikoagulation zu verantworten ist, kann jedoch auch schon bei jungen Patienten auf eine biologische Prothese zurückgegriffen werden. [9, 60, 61]



A



B

Abbildung 4-5; A: Xenograft aus Schweinegewebe; B: Homograft mit einem Teil ascendierender Aorta.

Quelle: BVMed-Bilderpool (Abb. 4-5; A)

4.3 Tissue Engineering

4.3.1 Hintergrund

Das Fach TE gilt als eines der jüngsten in der Medizin. Anfang der 90er Jahre tauchte der Begriff erstmalig auf und bedeutet wörtlich übersetzt „Gewebekonstruktion“. Etwas weiter gefasst könnte man TE als Aufbau und Bearbeitung von organischem Gewebe beschreiben. Der Bereich TE umfasst neben der Medizin auch Wissen und Erkenntnisse aus Ingenieurs- und anderen Naturwissenschaften. Dieses „Know-how“ macht man sich zu Nutze, um durch eine geschickte Kombination von Zellen mit einem Zellträgersystem (Scaffold) und deren Bearbeitung funktionelle Gewebestücke oder ganze Organe nachzubilden. So könnten pathologische bzw. zerstörte Gewebe und/oder Organe des Menschen imitiert und durch ein Implantat ersetzt werden. In diesem Fall spricht man bei dem erzeugten Gewebe und/oder Organ von einem Organoid. Durch eine möglichst genaue Imitation der anatomischen und physiologischen Eigenschaften erhofft man sich gar keine oder nur sehr geringe Nebenwirkungen und Komplikationen. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit tissue-engineerter Gewebe ist der Einsatz in *in-vitro* Experimenten als Ersatz für Tierversuche. Durch eine möglichst strenge strukturelle und funktionelle Imitation des natürlichen Gewebes sind gute Reliabilität und hohe Reproduzierbarkeit die entscheidenden Faktoren für die hohe Aussagekraft solcher Experimente. In der Nomenklatur werden solche Gewebe als Histoide bezeichnet. [62-65]

Die im TE verwendeten Zellträgersysteme bzw. Gerüste können entweder aus biologischen oder aus synthetischen Materialien hergestellt werden. Zweck dieser Gerüste ist eine dreidimensionale Formgebung des Gewebes sowie die Schaffung von Anreizen zur funktionellen Entwicklung der verwendeten Zellen. Um als Trägermaterial für Zellen in Frage zu kommen, muss ein Werkstoff unzählige biologische, physikalische und chemische Eigenschaften erfüllen. Seine Atoxizität spielt hier genauso eine Rolle wie eine adäquate Oberflächencharakteristik, welche durch Polarität, Benetzbarkeit, chemische Funktionalisierung und Veränderung der Topographie beeinflusst werden kann. Unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren wird das Maß der Akzeptanz von Materialien durch Zellen, Gewebe und/oder den Körper auch als Biokompatibilität bezeichnet. [65, 66]

Es kann zwischen zwei verschiedene Arten von Gerüsten unterschieden werden. Auf der einen Seite gibt es Zellträger aus resorbierbarem Material, welche vor allem die Funktion einer temporären, insbesondere anfänglichen Formgebung haben. So sollen sie nach der strukturellen Organisation der Zellen und dem Aufbau einer autarken extrazellulären Matrix ohne Einbußen von Funktionalität und Struktur des neuen Gewebes resorbiert werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass bei Geweben mit hohen physikalischen Belastungen eine ausreichende autonome Festigkeit/Stabilität zum Zeitpunkt der Resorption noch nicht gegeben sein kann. Mögliche inflammatorische Prozesse beim Abbau dieser resorbierbaren Stoffe können ebenfalls negative Einflüsse auf die Funktionalität und Belastbarkeit eines solchen Konstrukts haben. Deshalb müssen bei der Evaluation eines resorbierbaren Materials auch immer seine Zerfallsprodukte auf Zelltoxizität und Biokompatibilität untersucht werden. [67-70]

Die andere große Gruppe von Gerüsten besteht aus nicht-resorbierbaren Materialien biologischer und synthetischer Art. Ihr großer Vorteil besteht vor allem in der von Anfang an vorhandenen und dauerhaften großen physikalischen Belastungsfähigkeit. Auch ist ihr Einsatz meist mit einer einfacheren Herstellung und Handhabung verbunden. Gegen ihre Verwendung kann jedoch der dauerhafte Verbleib am Zielort sprechen. Außerdem können Fremdkörperoberflächen inflammatorische und/oder thrombogene Reaktionen auslösen. [69]

Zur Beschaffung der benötigten Zellen kann man heutzutage auf eine Vielzahl an unterschiedlichsten Zellquellen zurückgreifen. Je nach Fragestellung bzw. Anforderung können bereits fertig ausdifferenzierte Zellen, embryonale oder postembryonale Stammzellen verwendet werden. Postembryonale Stammzellen bezeichnen sowohl adulte, zu denen auch mesenchymale Stammzellen gehören, als auch induzierte pluripotente Stammzellen, welche durch die Re-Programmierung ausdifferenzierter Zellen hervor gehen. Jede dieser möglichen Zellquellen besitzt neben ihren Vorteilen aber auch etliche Nachteile. [71-73]

So haben embryonale Stammzellen zwar den Vorteil einer sehr hohen Plastizität, und sie lassen sich im Prinzip in jede Zellart ausdifferenzieren (Pluripotenz). Es muss aber auch bedacht werden, dass diese ein vielfach höheres Risiko der Entartung als andere Zellquellen mit sich bringen. Außerdem müsste bei einer nicht-autologen Transplantation die immunologisch bedingte Abstoßungsreaktion medikamentös unterdrückt werden. Ein zusätzlicher „nicht-medizinischer“ Grund gegen ihren Einsatz

sind multiple moralisch-ethische Bedenken. Aufgrund dieser Bedenken ist die Verwendung und Forschung an diesen Zellen durch den Gesetzgeber zum Teil stark eingeschränkt bzw. verboten worden. [74-78]

Der Verwendung adulter Stammzellen stehen solche Bedenken hingegen nicht im Weg. Mögliche Abstoßungsreaktionen entfallen durch ihre meist autologe Verwendung. Durch ihre Teildifferenzierung ist ihre Plastizität jedoch eingeschränkt, und sie lassen sich nur noch in unterschiedliche, bereits vorgegebene Zellarten ausdifferenzieren (Multipotenz). Ein weiterer Nachteil ist ihre limitierte Verfügbarkeit, bedingt durch geringe Zellmengen im Gewebe und zum Teil schwierige Akzessibilität. Das Risiko einer Entartung bei diesen Zellen ist noch nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert [79-82].

Für den Einsatz von ausdifferenzierten Zellen hingegen spricht die einfache und relativ unproblematische Zellgewinnung, da das Gewebe meist in ausreichender Menge vorliegt. Zudem ist ein Entartungsrisiko als eher gering einzuschätzen. Mögliche Nachteile sind ihr fertig ausdifferenziertes Vorliegen und eine eingeschränkte Vermehrbarkeit. [20, 83]

Bei der Erschaffung eines Organoids zur Implantation sollte man sich immer vor Augen führen, dass jede Zelle im menschlichen Körper einer Unzahl an Stressoren ausgesetzt ist. Hierzu zählen beispielsweise oxidativer Stress als eine chemische Komponente, aber auch die physikalische Belastung durch Zerr-, Druck und Scherkräfte, sowie elektrische Ströme im Nerven- und Muskelgewebe. Um bei einer Implantation eine Überbeanspruchung durch diese Stressoren zu verhindern und damit das Überleben der einzelnen Zellen und die Funktionalität des gesamten Organoids gewährleisten zu können, ist eine Adaptierungsphase nötig. Während dieser Phase kann eine schrittweise Gewöhnung an die äußeren Einflüsse und Reize stattfinden. Diese Gewöhnung und die Einhaltung kontrollierbarer und reproduzierbarer Bedingungen versucht man durch die Inkubation in Bioreaktoren zu gewährleisten. [84, 85]

4.3.2 Bioreaktoren

Als Bioreaktoren werden alle offenen und geschlossenen Behälter und Systeme bezeichnet, deren Ziel es ist, Zellen, Mikroorganismen oder kleine Pflanzen zu kultivieren. Die Erfindung und die erstmalige Verwendung des Prinzips von

Bioreaktoren fand vor über 5500 Jahren durch den Einsatz von Gärgefäßen in der Bierherstellung statt. Im Laufe der Zeit wurde diese Technologie weiter entwickelt, und es kamen viele neue Einsatzmöglichkeiten hinzu. Heutzutage finden Bioreaktoren ihren Einsatz in der Medizintechnik, der pharmazeutischen Industrie, in der Gewinnung von Grundchemikalien für die Chemieindustrie, in der Lebensmittelindustrie und auch in der Abwasser- und Müllentsorgung. Um eine hohe Effizienz gewährleisten zu können, ist es nötig, möglichst physiologische Bedingungen zur Kultivierung zu schaffen. Hierzu müssen Temperatur, pH-Wert, Nährstoffe und Gaskonzentrationen, aber auch die anfallenden (Abfall-)Produkte ständig überwacht und angepasst werden. In vielen Fällen, insbesondere in der Lebensmittelindustrie, der Medizintechnik und der pharmazeutischen Industrie werden zudem hohe Reinheitsansprüche an die gewonnenen Produkte gestellt, was in diesen Fällen eine komplette Isolation der Prozesse nötig macht. [86-88]

Im Bereich der Medizintechnik, insbesondere im Bereich TE, lassen sich drei Arten von Bioreaktoren unterscheiden:

Die erste und von Aufbau und Funktion die einfachste Art von Bioreaktoren dient zur Züchtung von Zellen. Zu ihnen können bereits Zellkulturflaschen gezählt werden. Hierbei steht die Bereitstellung einer optimalen physiologischen Umgebung unter sterilen Bedingungen im Vordergrund. Hier kommen neben den meist verwendeten „Brutschrankbedingungen“ von 37°C und einer CO₂ Konzentration der Umgebungsluft von 5% zudem Nährmedien mit zellspezifischen Zusammensetzungen und pH-Werten zum Einsatz. [84, 86, 89, 90]

Bei der zweiten Art von Bioreaktoren, den sogenannte Besiedlungsreaktoren, findet die Vereinigung von Zellen und Zellträger statt. Auch sie benötigen als Voraussetzung für ein effektives Arbeiten physiologische Bedingungen, damit die Zellvitalität erhalten bleibt. In ihrer Funktionsweise können je nach Architektur des Zellträgers jedoch unterschiedliche Techniken zum Einsatz kommen. Die Methodik der statischen Besiedelung findet fast ausschließlich bei zwei-dimensionalen Zellträgern statt. Durch die Schwerkraft setzen sich dabei die Zellen auf dem Untergrund ab. Bei einer ebenen und waagrechten Fläche wird so eine effektive und gleichmäßige Zellbesiedelung erreicht. Bei komplexeren, dreidimensionalen Zellträgern ist eine gleichmäßige Zellbesiedelung unter statischen Bedingungen nicht möglich, da sich die Zellen nur auf den nach oben gerichteten Flächen anlagern würden. Um dennoch eine effektive und

gleichmäßige Zellschicht auf der ganzen Oberfläche zu erreichen, versetzt man den Zellträger in eine 3D Rotations- oder Taumelbewegung. Mit Hilfe dieser dynamischen Zellbesiedelung befindet sich idealerweise jeder Flächenabschnitt des Zellträgers zeitweise „unterhalb“ der Zellsuspension, wodurch sich die Zellen darauf absetzen können. [84, 86, 90]

Konditionierungsbioreaktoren zählen zur dritten Gruppe der Bioreaktoren. Grundvoraussetzung ist hier auch die Schaffung und der Erhalt einer physiologischen Atmosphäre. Ist dies gewährleistet, kann mit ihrer Hilfe die bereits erwähnte (Kap. 4.3.1) Gewöhnung an chemische und physikalische Stressoren durchgeführt werden. So können beispielsweise in der Herstellung orthopädischer Organoiden Zug, Druck und/oder Reibung die entscheidende Rolle zur Konditionierung spielen. Bei kardiovaskulären Organoiden können sowohl ein pulsatiler Fluss als auch rhythmische und/oder elektrische Reize nötig sein. Für eine optimale Konditionierung ist es unerlässlich, dass die Exposition der Zellen, respektive des Gewebes zu den Stressoren im Bioreaktor willkürlich beeinflusst und im Verlauf gesteigert werden kann. Ist die zeitliche Progression dabei günstig gewählt, können sich die Zellen durch Genexpressions- und damit verbundenen Stoffwechseländerungen an die äußerlichen Reize adaptieren. Die besondere Herausforderung beim TE besteht darin, die zunächst als „ungeordneter Zellhaufen“ vorliegenden Zellen zur Selbstorganisation und zum Aufbau einer EZM zu stimulieren, beides wesentliche Charakteristiken eines Organoids. [84, 86, 89, 91-94]

4.3.3 Tissue Engineering von Herzklappen

In der Entwicklung „tissue-engineerter“ Herzklappen wird versucht, die Vorteile vorhandener Herzklappenprothesen zu kombinieren und die Nachteile zu beseitigen. So wäre die lange Lebensdauer der mechanischen Herzklappen mit der thrombotisch inerten Oberfläche der biologischen Herzklappen bei einer „idealen Prothese“ kombiniert. Aktuell werden dafür drei unterschiedliche Strategien verfolgt: die Zellbeschichtung synthetischer nicht-resorbierbaren Zellträger, die Verwendung resorbierbarer Materialien und als dritte Möglichkeit der Einsatz oberflächenmodifizierter und beschichteter biologischer Transplantate. [83, 95]

Die erste Variante orientiert sich an der Idee bisheriger mechanischer Herzklappenprothesen. Durch die Basis aus einem stabilen, langlebigen Werkstoff lässt sich so eine lange Lebensdauer garantieren. Um das Problem der thrombogenen Eigenschaft der Prothesenoberfläche umgehen zu können, muss jedoch eine Oberflächenmodifikation durchgeführt werden. In Anlehnung an den histologischen Aufbau eines Blutgefäßes hat es sich dabei bewährt, das Fremdmaterial vom Blut durch eine Endothelbarriere zu trennen. Damit diese Endothelzellen (EC) jedoch den hohen flussbedingten Scherkräften, insbesondere in Aortenposition, standhalten können, bedarf es eines adäquaten Untergrundes und einer kompetenten festigenden EZM. Für ihren Aufbau haben sich hier die auch im histologischen Gefäßwandaufbau vorkommenden Fibroblasten (FB) und die glatten Muskelzellen (SMC) als die geeignetsten bewährt. Für einen stabilen Halt der Zellen sowie eine gute Verankerung der EZM sollte zudem eine geeignete Oberflächencharakteristik des Zellträgers gewählt werden (Kap. 4.3.1). [14, 21]

Der zweiten Möglichkeit, der Zellbesiedelung eines degradablen Gerüsts liegt der Gedanke des Mitwachsens einer Herzklappe zugrunde. Der resorbierbare Werkstoff stellt hierbei nur die anfänglich formgebende Matrix dar, in oder auf welche die Zellen ein-/aufgebracht werden. Im Resorptionszeitraum müssen die Zellen dann selbstständig eine stabile EZM aufbauen, um den zellulären Zusammenhalt und eine ausreichende strukturelle Stabilität der Herzklappe gewährleisten zu können. Deshalb wird auch bei diesem Verfahren meist auf die im histologischen Gefäßwand- und Herzklappensegelaufbau vorkommenden FB und SMC zurückgegriffen. Idealerweise wären also die nach vollständiger Resorption des Werkstoffes gebildete Herzklappe von ihrem bindegewebigen Aufbau und ihrer Festigkeit her mit einer humanen Klappe zu vergleichen. Bisherige Versuche mit tissue-engineerten Herzklappen aus biodegradablen Werkstoffen zeigten jedoch, dass diese selbst nach einer langen Resorptionsperiode nur kompetent genug waren, um Drücke und Scherkräfte in Pulmonalklappenposition auf Dauer widerstehen zu können. [96-100]

Die dritte Variante versucht, das Problem der geringen Lebensdauer bisheriger biologischer Herzklappenprothesen zu beseitigen. Nach aktuellem Kenntnisstand ist diese vor allem den inflammatorischen Prozessen durch Fremdartigene in und auf den Implantaten (insbesondere xenogenen Ursprungs), aber auch den Denaturierungen im Fixationsprozess dieser Herzklappen geschuldet. Deshalb versucht man, bei diesem

Verfahren durch eine Dezellularisierung und anschließende gründliche Spülung der biologischen Prothesen die Fremdantigene und die zelltoxischen Fixationsstoffe möglichst umfassend zu entfernen. Eine im Anschluss durchgeführte Zellbesiedelung hat den Zweck einer noch weitergehenden Expositionsverminderung von Antigenen zum immunologisch äußerst aktiven Blut. [59, 101-104]

Insbesondere bei der Entwicklung tissue-engineerter Herzklappen wird in fast allen Fällen auf die bereits beschriebene Konditionierung (Kap.: 4.3.1) in Bioreaktoren (Kap.: 4.3.2) zurückgegriffen. Die hohen Druck- und Scherkräfte, welche physiologischerweise auf alle Herzklappen, besonders auf die Aortenklappe (norm. systolischer Druck: 120 mmHg) wirken, machen eine Gewöhnungsphase essentiell. Optimalerweise werden die aus Zellen und Zellträger zusammengesetzten Herzklappen hierbei für längere Zeit in einem Bioreaktor inkubiert, welcher in der Lage sein sollte, die physiologisch wirkenden Kräfte zu imitieren. Zusätzlich sollte der Bioreaktor die Fähigkeit haben, einen anfangs geringen Puls und niedrigen Fluss kontinuierlich steigern zu können, um am Ende physiologische Konditionen bereitzustellen. So kann eine Überforderung der Zellen und des Gewebes ausgeschlossen und damit die Adaptation an die Druck- und Scherkräfte gewährleistet werden. [83, 93, 105, 106]

5 Methoden

5.1 Zellisolation und Zellkultivierung

5.1.1 Zellisolation

Im Rahmen der Zellgewinnung konnten die benötigten Endothelzellen (ECs) und Fibroblasten (FBs) enzymatisch aus Segmenten der Vena Saphena Magna isoliert werden. Die Gefäßstücke sind als Reste bei Bypassoperationen der Herzchirurgischen Abteilung angefallen und wurden deswegen anonymisiert für Forschungszwecke gelagert. Hierfür liegt eine Genehmigung der universitären Ethikkommission vor. Die „Spender-Patienten“ sind einzeln vor den Operationen aufgeklärt und in ihrer Entscheidungsfindung nicht beeinflusst worden. Die Zustimmung zur Verwendung ihrer Venen und Zellen konnte auch nach der Operation stattfinden (siehe Anhang: 2. Einverständniserklärung für Patienten zur Einwilligung der Verwendung ihrer Venenstücke).

Bis zur möglichst zeitnahen Zellextraktion wurden die Venensegmente gekühlt (4°C) in Medium M199 (Biochrom GmbH, Berlin, D) aufbewahrt. Vor der Extraktionsprozedur überprüfte man die Gefäßstücke auf ihre Eignung. Hierbei spielten neben Lagerungsdauer (Ausschlusskriterium: >6 Tage Lagerung), auch die Länge (Ausschlusskriterium: <3,5 cm) sowie eventuelle Schäden eine Rolle. Geeignete Stücke konnten anschließend beidseitig kanüliert und mit 3-Wegehähnen versehen werden (siehe Abb. 5-1).



Abbildung 5-1; Beidseitig kanüliertes Segment der Vena Saphena Magna (mit 3-Wegehähnen versehen).

Mit dem Durchspülen von Spülmedium (494 ml M199 + 5 ml Gentamycin; Biochrom GmbH + 5000 i.E. Heparin; Ratiopharm GmbH, Ulm, D) konnten im nächsten Schritt neben der Überprüfung der Dichtigkeit auch Zellablagerungen und Blutreste entfernt werden.

Zunächst wurden die das Gefäßlumen auskleidenden ECs und in einem zweiten Schritt die darunter liegenden FBs extrahiert. Zur EC-Gewinnung löste eine Trypsin-EDTA-Lösung (10 x; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D) im Venenlumen während einer 25 minütigen Inkubationszeit die Zellen ab. In diesem Zeitraum lagen die Segmente unter physiologischen Bedingung im Brutschrank in phosphatgepufferter Saline (PBS; Biochrom GmbH). Eine Spülung mit M199 und FCS (Stoppmedium; FCS: Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) stoppte die enzymatische Reaktion anschließend, und die so gewonnene Zellsuspension ist für 7 Minuten bei 500 U / min zentrifugiert worden. Im Anschluss wurde der Überstand an Flüssigkeit abgenommen und das am Boden abgesetzte Zellpellet mit ausreichend Endothelzellmedium (Promocell GmbH, Heidelberg, D) suspendiert und in eine 12,5 cm² große Zellkulturflasche überführt.

Unter gleichen Umgebungsbedingungen ist anschließend während einer 30 minütigen Inkubation mit 0,5%iger Kollagenaselösung (Worthington Corp., Lakewood, US) die Fibroblastengewinnung durchgeführt worden. Darauf folgend konnte, äquivalent zur EC-Gewinnung die Enzymreaktion gestoppt, die Suspension zentrifugiert und das Zellpellet mit FB-Medium (Promocell GmbH) suspendiert werden. Anschließend wurden auch diese Zellen in eine Zellkulturflasche mit 12,5 cm² Grundfläche überführt.

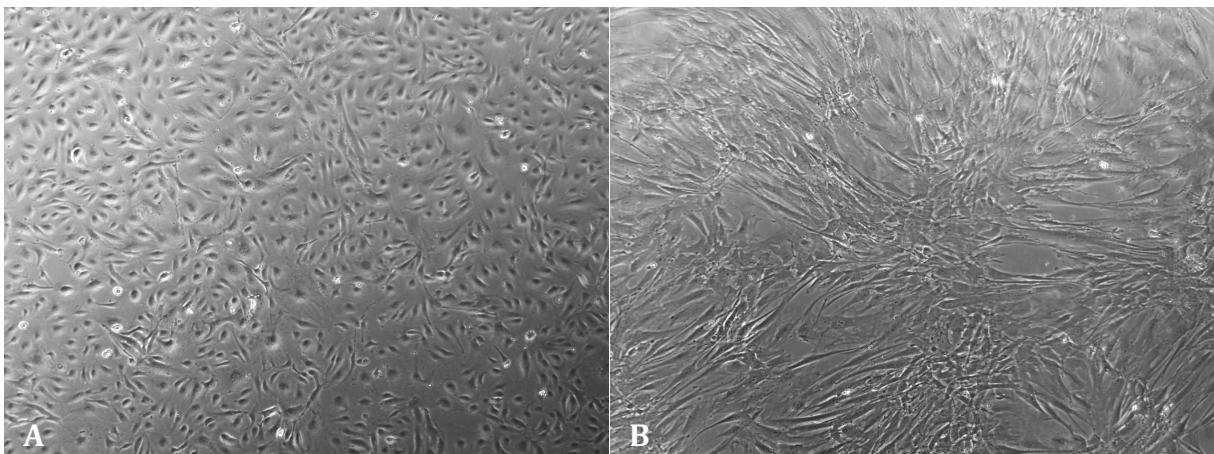


Abbildung 5-2; A: Konfluenter Endothelzelllayer; B: Konfluenter Fibroblasten Zelllayer; Aufnahmen von Zellkulturflaschen unter dem Phasenkontrastmikroskop.

5.1.2 Zellkultivierung

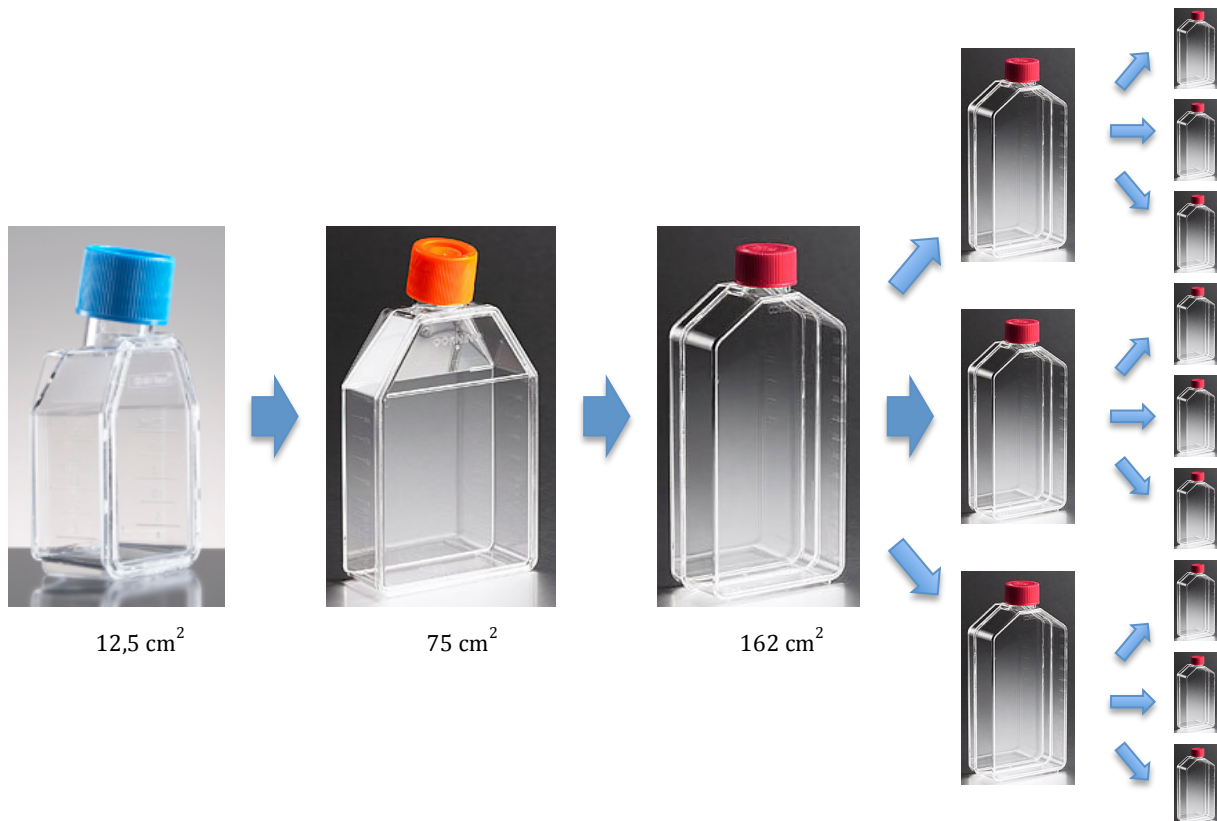
Die Zellkultivierung fand unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank statt. Drei mal wöchentlich ist ein Zellmediumwechsel durchgeführt worden. Sobald der Boden einer Zellkulturflasche von einer konfluenten Zellschicht (siehe Abb. 5-2 A+B) überzogen war, wurde eine Subkultivierung nötig. Hierfür sind die Zellen, nach einem Spülvorgang mit PBS, durch Trypsin (1:20 in PBS) enzymatisch von ihrem Untergrund abgelöst worden (siehe Tab. 5-1).

Tabelle 5-1 Verhältnis Trypsinmenge zu Kulturflaschengröße

Kulturflaschengröße	Trypsinmenge
12,5 cm ²	1 ml
75 cm ²	2 ml
162 cm ²	3,5 ml

Nach der optischen Kontrolle der Zellablösung unter dem Lichtmikroskop stoppte man mittels eines Zellmedium-FCS-Gemisches (10:1) die enzymatische Reaktion, und die nun erhaltene Zellsuspension wurde bei 500 Umdrehungen für 7 Minuten zentrifugiert. Nach der Resuspension des gewonnenen Zellpellets brachte man die Zellen auf einer entsprechend größeren Wachstumsfläche aus. Die Vergrößerung der Wachstumsfläche fand anhand des nachfolgenden Schemas statt:

Schema 5-1; Schematische Darstellung des Passagierens der Zellen mit Größe und Anzahl der verwendeten Kulturflaschen



Nachdem im Passagieren der Zellen in den ersten drei Schritten zunächst nur die Zellkulturflaschen vergrößert werden, wird ab dem vierten Schritt die Anzahl der Flaschen vergrößert.

Quelle: 12,5 cm² -Zellkulturflasche: BD Bioscience, Heidelberg, D; 75 cm² + 162 cm²-Zellkulturflaschen: Corning Life Science, Amsterdam, NL

5.1.3 Kryokonservierung

Da nicht alle gewonnenen und herangezuchteten Zellen eine direkte Verwendung fanden, wurde es teilweise nötig, diese zu kryokonservieren. Die Zellen sind hierfür in einem zweistufigen Verfahren eingefroren und gelagert worden: zuerst bei -80 °C im Ultra-Tiefkühlschrank und später bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Die ersten Schritte des Einfrierprozesses gleichen denen des „Trypsinierens“ im Rahmen des Splittens der Zellkulturflaschen. Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension wurde das gewonnene Zellpellet jedoch mit einem Gemisch aus 70% Zellmedium, 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich GmbH) resuspendiert. Anschließend konnte die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und eingefroren werden. Um einen möglichst zellschonenden Umgang während des Einfrierprozesses gewährleisten zu können, wurde die Prozedur in Kryoboxen der Firma Nalgene

(Mindesttemperaturabnahme von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) durchgeführt. Durch diese Maßnahme und den Zusatz von DMSO lässt sich eine zellzerstörende Eiskristallbildung verhindern (siehe Abb. 5-3).

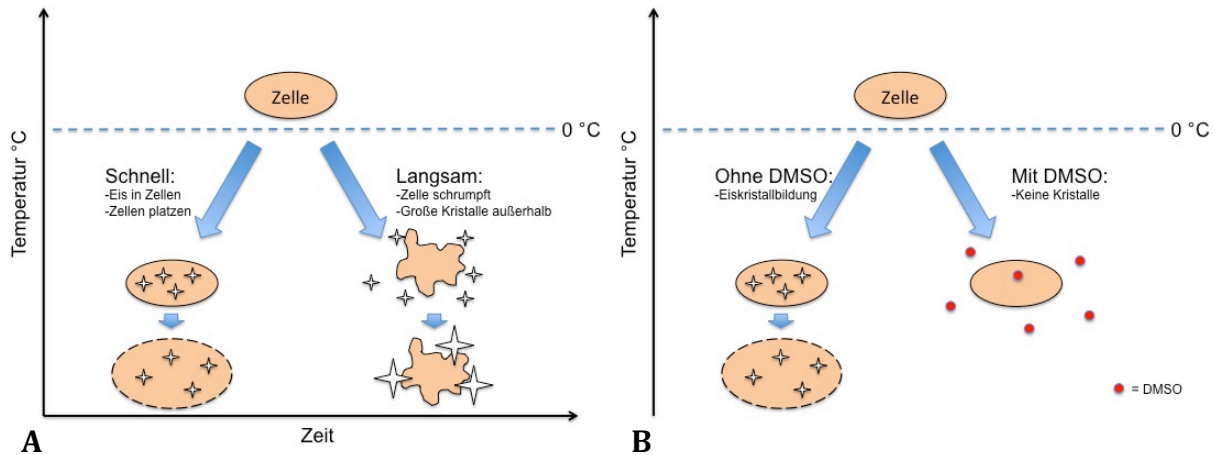


Abbildung 5-3; A: Schematische Darstellung der zellzerstörenden Eiskristallbildung sowohl bei langsamem als auch bei schnellem Einfrierprozess. Bei schnellem Einfrieren platzen die Zellen aufgrund der niedrigeren Dichte des Eises. Bei langsamem Einfrieren werden die Zellwände durch Eiskristalle zerstört; **B:** Wirkungsweise des Gefrierschutzmittels DMSO durch Verhinderung der Eiskristallbildung.

Zum Auftauen resuspendierte man die gefrorenen Zellen mit einer Mischung aus Medium und FCS (10:1). Aufgrund der Zelltoxizität des DMSO war ein schnelles Vorgehen bei diesem Schritt essentiell. Äquivalent zum „Trypsinieren“ folgten nun eine fünfminütige Zentrifugation, eine Resuspension mit entsprechendem Zellmedium und eine Verteilung der Zellen auf Kulturflaschen der Größe 162 cm^2 .

5.2 Zellbesiedelung und Konditionierung

5.2.1 Herstellung der Polyurethanherzklappen

Im Rahmen dieser Arbeit stellte das Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) in Denkendorf die benötigten Polyurethanherzklappen im Sprühverfahren (Patent: DE 28 06 030 C2) her (siehe Abb.: 5-4; A). Es wurde eine Faserdicke zwischen 100 nm und 550 nm festgelegt.

Die für den Sprühprozess benötigte Negativform konnte mittels eines Gummiabgusses des Aortenlumens eines Herzklappenhomografts angefertigt werden. Die angefertigte

zweiteilige Sprühform wurde als Universalform zur Herstellung der Polyurethanherzklappen verwendet.

Zur Herzklappenherstellung wurde nun als erstes das Positiv mit Polyurethan (Polyurethan gelöst in Chloroform; Typenbezeichnung: Vasomer ®) besprüht. Die PU-Gewebedicke wurde auf 0,3 mm festgelegt. Anschließend konnte der Negativabdruck aus Gummi eingesetzt (siehe Abb.: 5-4; B) und eine äußere Schicht (die spätere Aortenwand) aufgesprüht werden. Nach vollständigem Verdampfen des Chloroforms sind sowohl Gummi- als auch Metallform entfernt und die nun fertigen Herzklappen zur Sterilisation geschickt worden. Die Gammasterilisation fand mit 10 kGy unter zertifizierten Bedingungen statt.

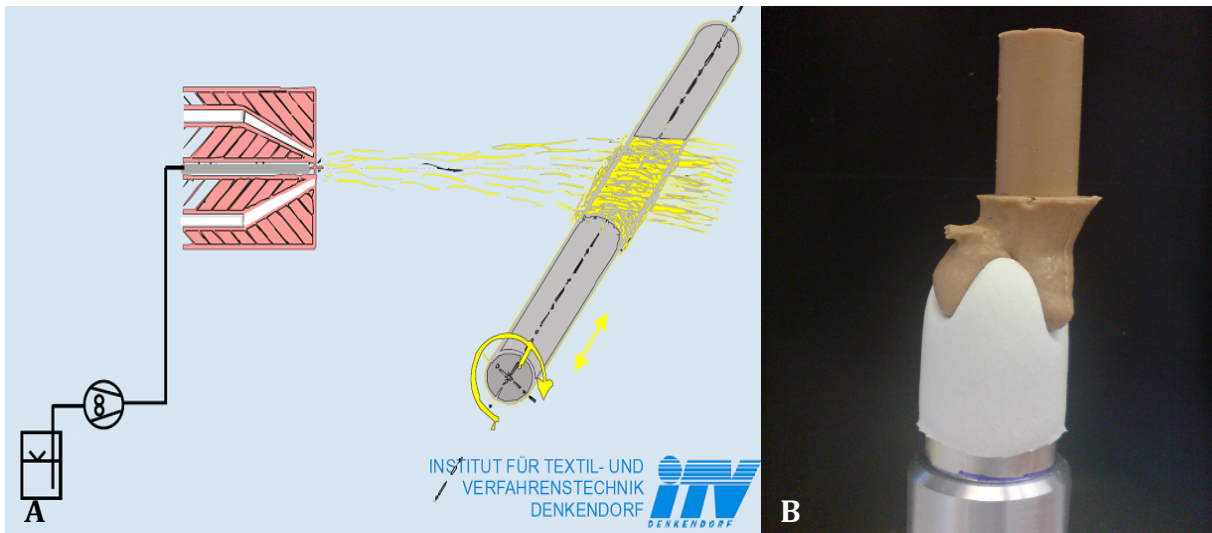


Abbildung 5-4; A: Schematisiertes 3-dimensionales Sprühverfahren zur Polyurethanherzklappenherstellung; B: Besprühter Positivabdruck einer Herzklappe mit eingesetztem negativem Gummiabguss vor dem Aufsprühen der Aortenwand.

5.2.2 Vorbereitung der Herzklappen

Für die Versuche wurden die Polyurethanherzklappen (siehe Abb. 5-5; A) als Gruppe A und die Homografts (siehe Abb. 5-5; B) als Gruppe B definiert. Für jede Versuchsgruppe wurde die Anzahl der Herzklappen auf 4 festgelegt (Gruppe A n=4, N1-PU ... N4-PU; Gruppe B n=4, N1-HO ... N4-HO). Jeweils eine Herzklappe der Gruppe A und der Gruppe B wurden mit den Zellen einer Zellkulturlinie besiedelt. So war ein direkter Vergleich der zwei unterschiedlichen Herzklappenprothesen möglich.

Die für die Versuche aufgetauten Homografts hatten bei Entnahme ein durchschnittliches Alter von $52,25 \pm 5,74$ Jahren. Sie waren dreifach in Plastikbeuteln eingeschweißt und bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingelagert (Schematische Darstellung des Einfrierprozesses in Abb. 5-6). Zum Zeitpunkt des Auftauens hatten sie eine durchschnittliche Lagerzeit von $7,33 \pm 2,11$ Jahren. Um ihre Sterilität gewährleisten zu können, wurden sie in einem 3-stufigen Verfahren aufgetaut. Nach Prüfung der Unversehrtheit der Packungen konnten sie zunächst in 56°C warmen Wasser angetaut werden. Wegen der Lagerung in flüssigen Stickstoff sowie dem unsterilen Umgang mit den eingeschweißten Packungen der Homograftherzklappen wurde dieser Vorgang unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Anschließend ist der äußere Beutel geöffnet und die darin befindliche, in zwei weiteren Beuteln verpackte Herzklappe steril entnommen und in sterile Ringerlösung überführt worden. Hier wurden die Beutel weiter angetaut und anschließend geöffnet, um die Herzklappe zu entnehmen und in M199 ausführlich zu waschen. [107]

Für einen einfachen und unkomplizierten Umgang mit den Herzklappen während der Versuche, wurden diese an spezielle Teflonhalterungen (siehe Abb. 5-5; C) genäht. Beim Einnähen wurden die Polyurethanherzklappen mit fortlaufender Naht und die Homografts basal an sechs bis acht Stellen mit einzelnen Knoten fixiert. Als Nahtmaterial diente „Suprolene 3/0“ (Resorba Medical GmbH, Nürnberg, D) Faden. Es wurde darauf geachtet, dass sich nach dem Einnähen der Herzklappen deren Segel einwandfrei öffnen und schließen konnten.

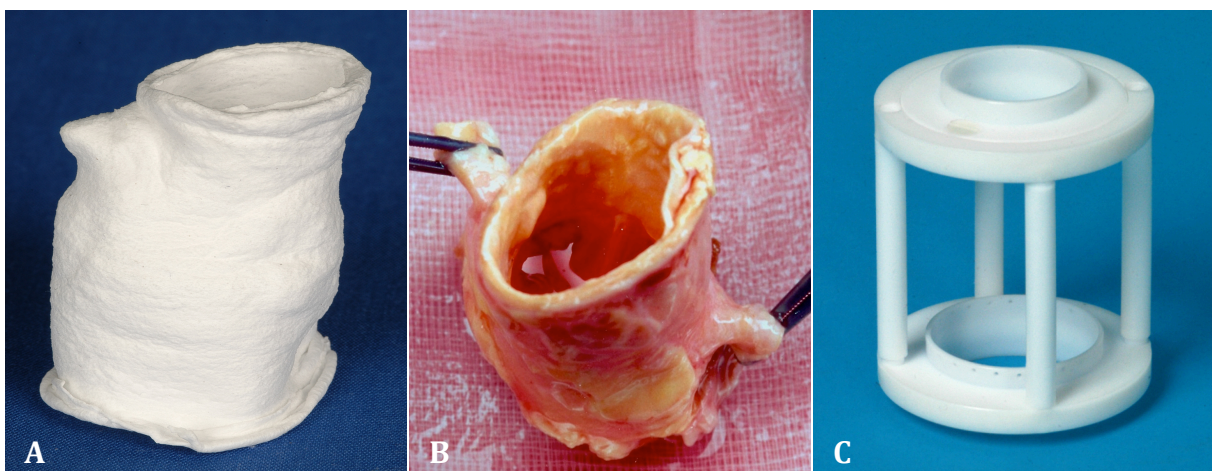


Abbildung 5-5; A: Im Sprühverfahren hergestellte Polyurethanherzklappe ($\varnothing = 24$ mm) = Gruppe A (n=4); B: kryokonserviertes und aufgetautes Homograft ($\varnothing = 27$ mm) = Gruppe B (n=4); C: Teflon™-Halterung der Herzklappen zur Befestigung im Besiedelungs- und Konditionierungsbioreaktor.

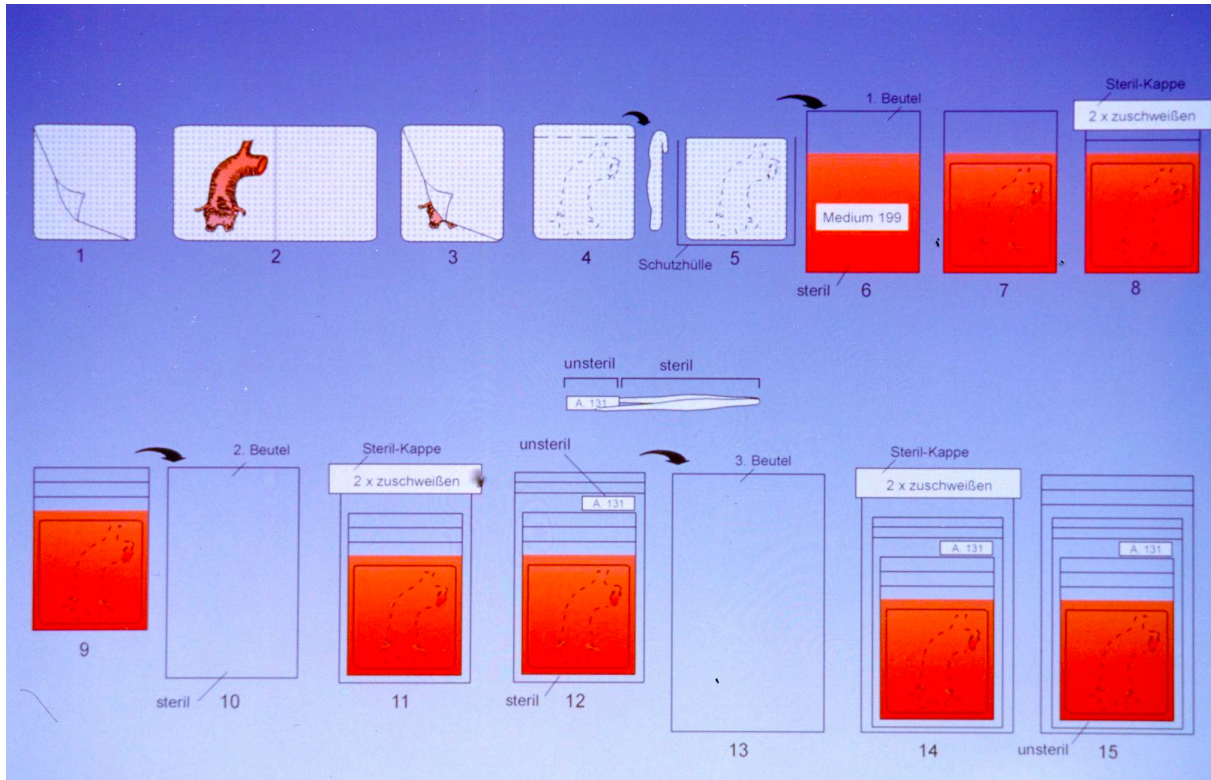


Abbildung 5-6; Schrittweise Darstellung des Verpackungsprozesses zur Kryokonservierung von Homografts; Die Schritte 1-5 zeigen das Verpacken in Mullkompressen, die Schritte 6-12 stellen die zwei Einschweißschritte unter sterilen Bedingungen und die Schritte 13-15 den letzten unsterilen Einschweißprozess dar. Der durchgeführte Auftauprozess fand entsprechend in umgekehrter Reihenfolge statt.

5.2.3 Zellbesiedelung

Zur Vorbereitung der Konditionierungsversuche im Bioreaktor mussten die Herzklappen mit Zellen besiedelt werden. Die aufgetauten Homografts und die Polyurethanherzklappen dienten den Zellen hierbei als Grundgerüst. Für eine solche Zellbesiedelung wurde als Durchschnittszellzahl 1,5 Millionen Zellen pro cm^2 Zellträgerfläche definiert. So ergab sich aus einer durchschnittlichen Herzklappenoberfläche von ca. 60 cm^2 (Höhe der Herzklappen: 5cm; Durchmesser: ca. 2cm; Besiedelung auf Innen- und Außenfläche) eine zu erreichende Zellzahl von 90 Millionen. Bei durchschnittlich 3-3,5 Millionen Zellen pro 162-cm^2 -Zellkulturflasche wurden folglich mindestens 25 Zellkulturflaschen benötigt.

Die Zellen der benötigten Zellkulturflaschen plus einiger Reserve-Flaschen wurden für die Zellbesiedelung zunächst analog des „Trypsinierens“ (5.1.2) abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert. Hierbei war darauf zu achten, dass das Volumen des Resuspensionsmediums möglichst gering gehalten wurde. Anschließend wurde die

Gesamtzellzahl der Suspension bestimmt und entsprechend Flüssigkeit abgenommen, um die gewünschte Besiedlungszellzahl von mind. 90 Millionen Zellen zu erreichen.

Zur Zellzahlermittlung wurden 20-50 µl der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop konnten nun die Zellen gezählt werden. Hierbei konnte zwischen lebenden (erscheinen weißlich-hell) und toten (erscheinen dunkelblau) Zellen unterschieden werden. Anhand der in der Zählkammer gezählten Zellen und folgender Formel konnte nun die Gesamtzellzahl errechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ml} \times 10000}{\text{Großquadranten}}$$

Tabelle 5-2; Erklärung

Zellen	Anzahl, der unter dem Lichtmikroskop gezählten Zellen
Verdünnungsfaktor	Verhältnis der Verdünnung mit Trypanblau
ml	Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml
Großquadranten	Anzahl der gezählten Felder der Zählkammer

Für den Besiedelungsvorgang wurde die eingenähte Herzklappe mit Zellsuspension in einen Besiedelungszyylinder gegeben und mit Zellmedium komplett aufgefüllt. In einem speziellen Antrieb (siehe Abb. 5-7) wurde der Besiedelungszyylinder nun für 24 Stunden in definierten Zeitintervallen von 30 Minuten für 2,5 Minuten bewegt. Durch die Konstruktion des Bioreaktors wird der Besiedelungszyylinder in zwei unterschiedlichen Achsen gedreht und so eine zu besiedelnde Herzklappe immer dreidimensional bewegt. Diese Bewegung stellt sicher, dass sich während der Bewegungsstopps des Bioreaktors Zellen auf anderen Teilen der Herzklappe absetzen und so eine 3D-Zellverteilung erreicht wird.

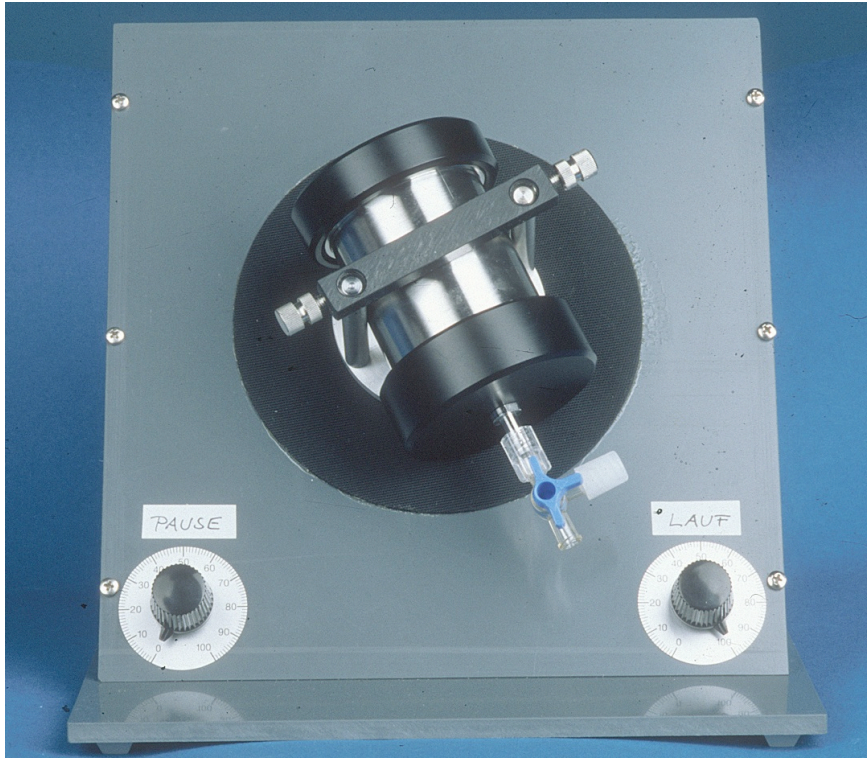


Abbildung 5-7; Besiedelungsbioreaktor zur 3-dimensionalen Zellbesiedelung durch Drehung in 2 Achsen (Besiedelungszylinder um seine zentrale Achse + Drehung des gesamten Besiedelungszylinders). Die Zellbesiedelung dauerte 24 Stunden, unterteilt in sich abwechselnde 2,5-minütige Rotations- und 30-minütige Ruhephasen.

Nach dem Beschichtungszeitraum wurden die im Medium frei schwimmenden Zellen gezählt, um die Anzahl der auf der Herzklappe abgesetzten Zellen zu berechnen. So wurden die Zellträger mit durchschnittlich 92.11 ± 11.08 Millionen FB und 96.48 ± 8.05 Millionen EC beschichtet.

Abschließend wurde die Herzklappe in einem Becherglas mit Zellmedium für 24 Stunden ruhen gelassen. Mit dieser Ruhephase wurde den Zellen zusätzliche Zeit eingeräumt, um stärkere Bindungen untereinander zu knüpfen und eine stärkere Adhäsion zum Trägermaterial zu etablieren.

5.2.4 Zellkonditionierung

Um eine Zellkonditionierung der Herzklappen unter pulsatilem Fluss zu ermöglichen, wurde in Kooperationsarbeit mit der TU München ein Bioreaktor (siehe Abb. 5-8) entwickelt. In der Konzeption des Bioreaktors stand die möglichst genaue Imitation eines pulsatilen Blutflusses, sowie die Bereitstellung physiologischer Bedingungen für

die Zellen an oberster Stelle. Es wurde ebenfalls auf einen einfachen Auf- und Abbau, den sicheren Umgang im Betrieb und eine praktikable Sterilisation der Bauteile Wert gelegt. Ferner sollten die Klappen- bzw. Segelbewegungen mittels einer Kamera erfasst und dokumentiert werden können.

Nach Erstellung mehrerer Konzepte fiel die Entscheidung zugunsten eines dreiteiligen Bioreaktors aus, bestehend aus einer Steuer-, einer Antriebs- und einer sterilen/sterilisierbaren Konditionierungseinheit. Die Gesamtgröße des Bioreaktors wurde so konzipiert, dass eine Inkubation im Brutschrank vorgenommen werden kann. So konnte sowohl auf die Mess- und Regeleinheiten für Temperatur als auch für die der Gase O₂ und CO₂ verzichtet werden. Als nicht zelltoxische und nicht-reaktive Materialien wurden Plexiglas® (Polymethylmethacrylat), Teflon™ (Polytetrafluorethylen), Aluminium und Gummi für die Konditionierungseinheit gewählt. Anhand der erstellten Pläne wurden die Bauteile des Bioreaktors anschließend von den Klinikwerkstätten des Uniklinikums München am Standort Großhadern hergestellt.

Der so angefertigte Bioreaktor ermöglicht es, in der Konditionierungseinheit Herzklappen (siehe Abb. 5-8 B-1) über einen langen Zeitraum (> 15 d) unter sterilen Bedingungen einem pulsatilem Fluss auszusetzen. Die anhaltende Sterilität der Konditionierungseinheit konnte bereits in einem Vorversuch bewiesen werden. Hierfür wurden alle Teile des Bioreaktors gassterilisiert (Formaldehyd; Zertifiziertes Protokoll) und unter sterilen Bedingungen unter der „Lamina-Flow“ zusammengebaut. Während und nach einer anschließenden 15-tägigen Inkubations- und Aktionsphase konnten keine Kontamination der Probenkammer und keine Flüssigkeit in der Kammer unter der Silikonmembran (siehe Abb. 5-8 B-2) nachgewiesen werden. Weiterhin kann durch den Anschluss mehrerer 3-Wege-Hähne ein steriler Mediaustausch durchgeführt werden. Angeschlossene Sterilfilter ermöglichen den Gasaustausch zur Umgebungsluft.

Die Antriebseinheit des Bioreaktors besteht aus einem Kolben (siehe Abb. 5-8 B-3), welcher durch einen Motor (siehe Abb. 5-8 B-4) bewegt wird. Der vom Kolben erzeugte pulsatile Luftdruck wird dann an die Silikonmembran weitergegeben, welche die Bewegung auf das über ihr liegende Medium überträgt. Diese pulsatile Bewegung wird durch die eingesetzte Herzklappe und durch einen flussrichtenden Silikonring im Bioreaktor in einen zirkulären Fluss des Mediums umgesetzt. Durch die Steuereinheit ist es möglich, den Motor unterschiedlich schnell laufen zu lassen. So kann der Puls und damit auch das die Probe durchströmende Minutenvolumen verändert werden. Mit Hilfe

eines Endoskops (siehe Abb. 5-8 B-5) kann außerdem das Öffnungs- und Bewegungsverhalten eingesetzter Herzklappen beobachtet und dokumentiert werden (siehe Abb. 5-9). [22]

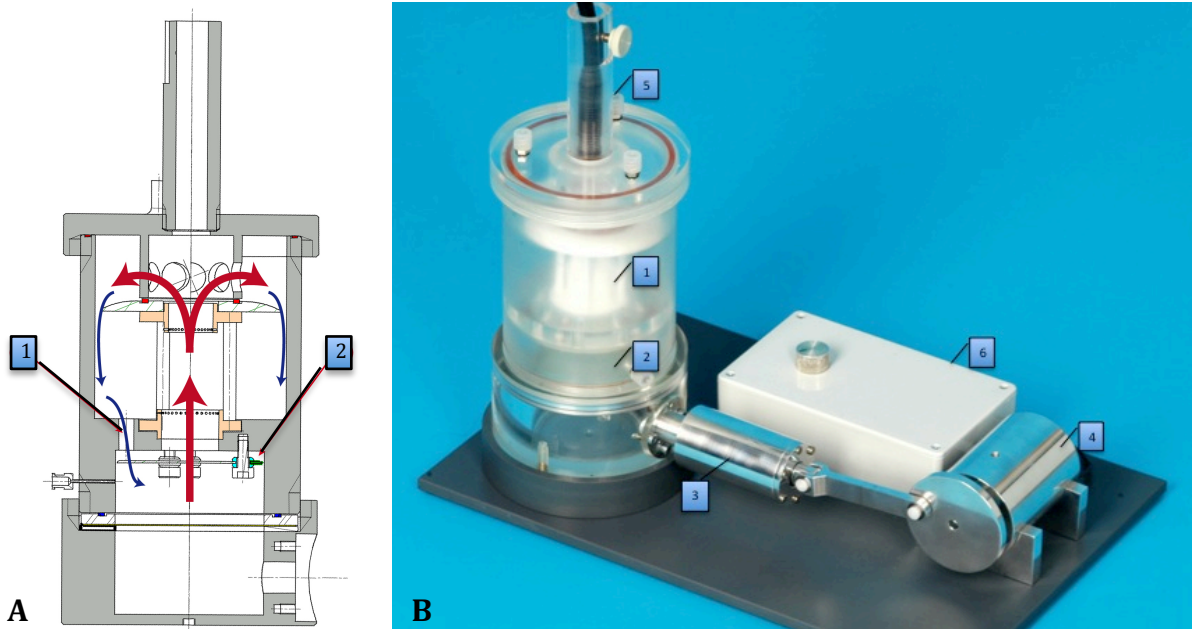


Abbildung 5-8; A: Schematische Darstellung der Konditionierungseinheit und des Mediumflusses mit zentraler Durchströmung der Herzklappe (rote Pfeile) und Rückfluss (blaue Pfeile). Über kleine zirkuläre Bohrungen (-1), welche in der „systolischen Phase“ von einem Silikonring (-2) verschlossen werden und die zentral eingesetzte Herzklappe wird dieser gerichtete Fluss erreicht; B: Konditionierungsbioreaktor (Foto) mit Konditionierungseinheit (Herzklappe: -1; Silikonmembran: -2); Antriebseinheit (Kolben: -3; Motor: -4) und Steuereinheit (-6). Zusätzlich ist ein Endoskop (-5) zur Dokumentation der Herzklappenbewegung angebracht.

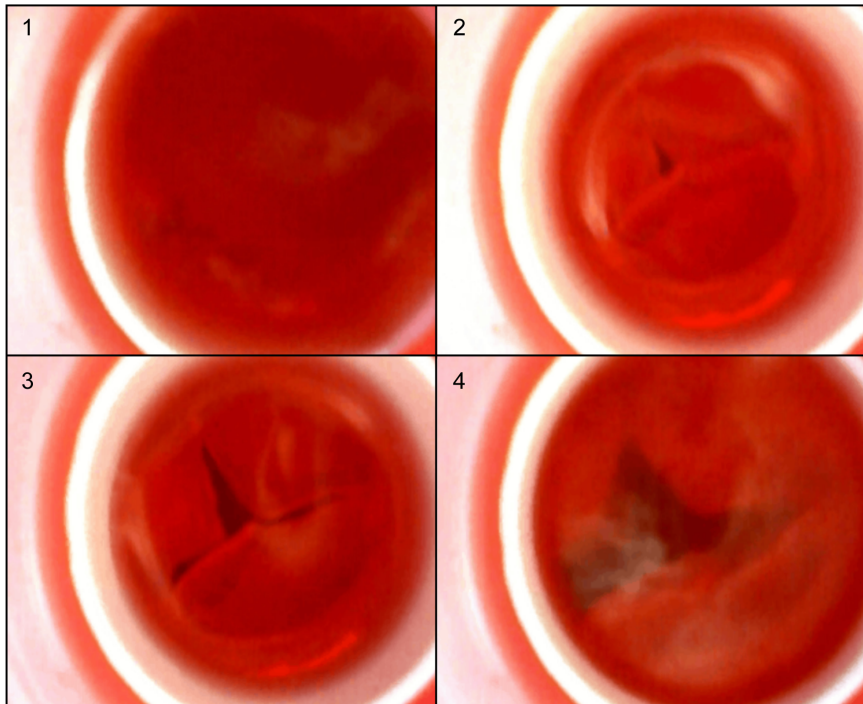


Abbildung 5-9; Endoskopische Aufnahmen der Herzklappenöffnung einer Dummy-Herzklappe von Diastole (Bild 1) bis zum „systolischen“ Medium-Auswurf mit geöffneten Segeln (Bild 4).

Nach der FB-Besiedelung mit anschließender 24-stündiger Ruhephase erfolgte für fünf Tage die Zellkonditionierung im Konditionierungsbioreaktor. Hierfür wurde die Teflon™-Halterung mit daran befestigter Herzklappe in die sterile Inkubationskammer überführt und diese mit 400 ml FB-Medium befüllt. Während der Konditionierungsphase fand eine zweistufige Puls- und damit Flussvolumensteigerung statt. In den ersten drei Tagen betrug das Flussvolumen pro Minute 750 ml (≈ 24 Schläge/ min), an den Tagen 4 und 5, 1100 ml / min (≈ 35.5 Schläge/ min). Am dritten Tag der Konditionierungsphase wurde zeitgleich zur Flussvolumensteigerung außerdem die Hälfte (200 ml) des Zellmediums ausgetauscht.

Direkt im Anschluss an diese erste Konditionierungsphase wurde die Herzklappe mit ECs beschichtet. Die bereits vorhandenen FBs dienten den ECs hierbei als Untergrund. Im Anschluss an eine ebenfalls 24-stündige Ruhephase folgte eine zweite Konditionierungsphase. Die zweite Besiedelungs- sowie Ruhe- und Konditionierungsphase wurden analog zum Ablauf der FB-Beschichtung und -Konditionierung durchgeführt. Als Zellmedium diente im zweiten Durchlauf Endothelzellmedium.

Tabelle 5-3; Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs

Versuchsschritt	Dauer	Fluss / min
Zellbesiedelung FBs	24 h	
Ruhephase	24 h	
1. Konditionierungsphase FBs	72 h	750 ml
2. Konditionierungsphase FBs	48 h	1100 ml
Zellbesiedelung ECs	24 h	
Ruhephase	24 h	
1. Konditionierungsphase ECs (+FBs)	72 h	750 ml
2. Konditionierungsphase ECs (+FBs)	48 h	1100 ml

Nach Abschluss der Zellkonditionierung wurden die Herzklappen zerschnitten und zur Analyse fixiert. Zum Zerschneiden und zur Probenbenennung wurde folgendes Schema herangezogen:

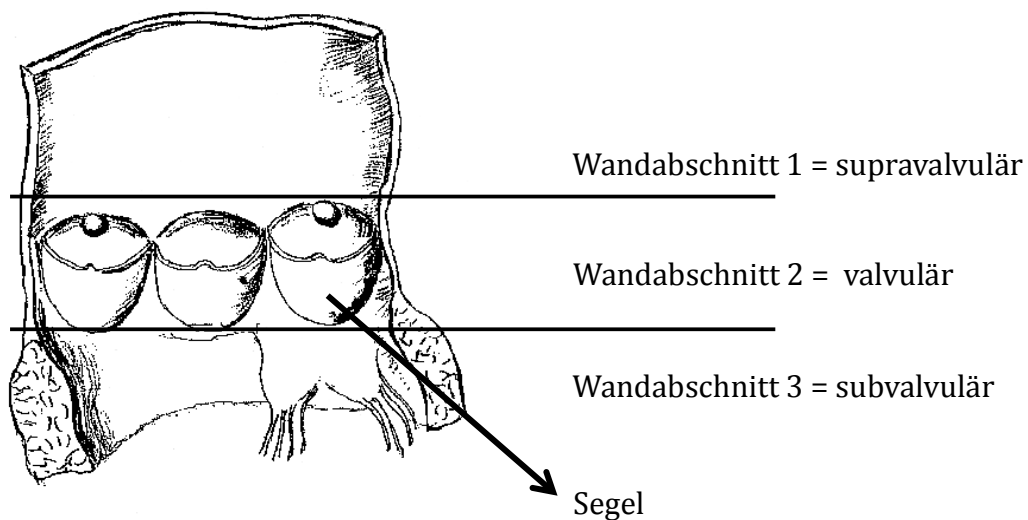


Abbildung 5-10; Skizze zur Probenentnahme und -bezeichnung.

Zusätzlich zu den am Schluss gewonnenen Proben wurden auch während der Versuche Proben zur Verlaufsanalyse genommen. Dazu gehörten neben Nativproben der Venen, Herzklappen und Zellkulturen auch Proben vom gesamten Konditionierungszeitraum. Auf die genauen Zeitpunkte zur Probenentnahme wurde streng geachtet.

Auf rasterelektronenmikroskopische Proben der Zellkulturen konnte verzichtet werden, da die topographische Analyse und Beschreibung der Zellkultur aufgrund der späteren kompletten Zellablösung keinerlei Aussagekraft für die Ergebnisse der Versuche hat. Ebenfalls war die immunhistochemische und molekularbiologische Auswertung der unbeschichteten Polyurethanherzklappen aufgrund fehlender Zellen und damit fehlender biologischer Aktivität und Strukturen nicht nötig.

Tabelle 5-4; Zeitplan zur Probenentnahme

Zeitpunkt	Polyurethan-HK			Homograft-HK		
	REM	IHC	PCR	REM	IHC	PCR
Zellkultur		X	X		X	X
Nativprobe der HK	X			X	X	X
Nach Besch. FBs /vor Kond.	X	X	X	X	X	X
Nach Kond. FBs	X	X	X	X	X	X
Nach Besch. ECs / vor Kond.	X	X	X	X	X	X
Nach Kond. ECs (+FBs)	X	X	X	X	X	X

6 Analyse

6.1 Rasterelektronenmikroskopie

6.1.1 Allgemeines

Um Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersuchen zu können, müssen diese zuvor fixiert, entwässert, getrocknet und leitend gemacht werden. Die Fixierung ist für den Erhalt der Probe während der Weiterverarbeitung und der Untersuchung erforderlich. Eine Entwässerung und Trocknung der Proben ist notwendig, da zum Zeitpunkt der Untersuchung im REM in der Untersuchungskammer ein Hochvakuum herrscht und vorhandene Flüssigkeiten unter Zerstörung der Probe verdampfen würden. Um ein schnelles und kontrollierbares Trocknen gewährleisten zu können, wird meist die Methode des Kritisch-Punkt-Trocknens verwendet.

Beim Kritisch-Punkt-Trocknen macht man sich die physikalische Eigenschaft zu nutze, dass bei bestimmter Temperatur und definiertem Druck Stoffe in flüssiger und gasförmiger Phase die gleiche Dichte haben. Das heißt, unter diesen Voraussetzungen kann ein Stoff gleichzeitig als Gas und als Flüssigkeit ohne sichtbaren Phasenübergang vorliegen. So ist es bei geeignetem Stoff/ Medium möglich, die REM-Proben zu trocknen, ohne dass es durch den sonst auftretenden Übergang zwischen flüssiger und gasförmiger Phase zu Beschädigungen der Probe kommt. Bei dem hierzu verwendeten CO₂ liegt dieser kritische Punkt bei 31°C und 73,8 bar. Ein mögliches Risiko ist allerdings, dass die Proben durch den Flüssigkeitsverlust bei diesem Vorgang etwas schrumpfen und sich kleine Risse, sogenannte Trocknungsartefakte, bilden können. [108]

Da die entwässerten Proben nun nicht mehr leitfähig sind, während der Untersuchung aber von einem Elektronenstrahl „abgerastert“ werden, müssen sie vor der Untersuchung mit einer sehr dünnen Schicht leitfähigem Material, meistens Gold, bedampft werden. Dieser Vorgang wird als „Sputtern“ bezeichnet. Um eine möglichst feine und detaillierte Oberflächenstruktur zu erhalten, wird versucht, dass sich die Goldatome einzeln auf der Probenoberfläche ablagern. Solche einzelnen Goldatome können durch Ionenbeschuss einer Goldkathode im Hochvakuum gewonnen werden und ergeben im Gesamten einen Goldnebel, welcher sich auf den Proben absetzt. Für

diesen Beschuss werden Edelgasatome ionisiert und mit Hilfe einer Hochspannung beschleunigt.

Abschließend findet die mikroskopische Bildgebung der Proben mittels des REM statt. Hierbei werden Elektronen an einer Glühkathode emittiert und mit Hilfe eines elektromagnetischen Feldes Richtung Probe beschleunigt und in elektromagnetischen Sammellinsen zu einem Elektronenstrahl gebündelt. Beim Auftreffen der Elektronen auf die Probe werden diese an den „Proben-Atomen“ abgelenkt oder setzen sogenannte „Sekundärelektronen“ aus ihnen frei. Die abgelenkten oder freigesetzten Elektronen können dann mit Hilfe von Detektoren nachgewiesen werden, was auf die Topographie der Probe rückschließen lässt. Diese Informationen können nun in unterschiedliche Grauwerte umgewandelt und digital dargestellt werden. Das Abrastern der Probe ist mit dem rasterförmigen Bildaufbau eines Röhrenfernsehers vergleichbar, und in dieser Weise wird auch das Bild der Probe aufgebaut. In den allermeisten Fällen wird die Untersuchung in einer evakuierten Kammer durchgeführt, um Artefakte durch Atome der Umgebungsluft zu vermeiden. Somit lässt sich auch rückschließen, dass mit Erhöhung des Vakuums die Schärfe des Bildes zunimmt. Diese lässt sich zudem durch den Durchmesser des Elektronenstrahls und der damit verbundenen Auflösung der Abrasterung beeinflussen. [109]

6.1.2 Fixierung

Die entnommenen Proben (Tabelle 5-4; Zeitplan zur Probenentnahme) wurden zur Fixierung und Lagerung zunächst in FIX II (456 ml Ampuwa, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D + 43,5 ml Glutaraldehyd; Sigma-Aldrich + 0,75 ml HCL; ICN GmbH, Northeim, D + 5,65 g Na-CaCO₃; Sigma-Aldrich. Siehe: 5.2. Medienzusammensetzung) bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Vor der Weiterverarbeitung und den abschließenden rasterelektronischen Aufnahmen ist eine Fixierungszeit von mindestens 48 Stunden nötig gewesen.

6.1.3 Alkoholreihe

Mit Hilfe der Alkoholreihe konnte das Fixiermedium FIX II durch das für das Kritisch-Punkt-Trocknen benötigte Medium Aceton (Merck KGaA) ersetzt werden. In Alkoholen aufsteigender Konzentrationen fand die Entwässerung der Proben für jeweils 10

Minuten statt. Diese 10-Minutenschritte beinhalteten Inkubationen in 30, 50, 70 und 96%igem Alkohol. Zum Abschluss sind die Proben von 96%igem Alkohol in reines, auf -20°C gekühltes Aceton überführt worden.

6.1.4 Kritisch-Punkt-Trocknen

Zur Probenverarbeitung wurde die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners mit den Proben sowie dem gekühlten Aceton gefüllt und anschließend verschlossen. Nachdem in der Kammer eine Temperatur von 8°C erreicht war, wurde das Aceton in mehreren Schritten durch CO₂ ersetzt. Anschließend wurde die Probenkammer über den kritischen Punkt von CO₂ (31°C) hinaus auf 42°C erwärmt. Durch diese „Übertemperatur“ konnten Kondensationseffekte auf den Proben während dem Ablassen des Gases und dem damit verbundenen Druckabfall verhindert werden. In einem Zeitintervall von mindestens 30 Minuten konnte nun das Gas langsam abgelassen werden. Die jetzt trockenen Proben sind anschließend entnommen worden.

6.1.5 Sputtern

Zur Beschichtung der Proben wurden diese zunächst in die Sputterkammer gesetzt und diese von Luft evakuiert. Gleichzeitig wurde eine geringe Menge Argongas eingebracht. Anschließend wurde der Sputtervorgang bei einer Spannung von 570 Volt (28 mA) für 180 Sekunden durchgeführt. Nach abschließender Belüftung konnten die Proben entnommen werden.

6.1.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Im Rasterelektronenmikroskop wurden die vorbereiteten Proben befestigt und anschließend in der Probenkammer ein Vakuum aufgebaut. Zur Detektion wurde ein SE- bzw. BSE-Detektor verwendet. Die Bildausgabe sowie die digitalisierte Speicherung erfolgten am Computer.

6.2 Immunhistochemie

6.2.1 Allgemeines

Zur Visualisierung bzw. zum Nachweis bestimmter Strukturen und Proteine können in der Histologie spezifische Antikörper (AK) verwendet werden. Produziert werden diese AK von verschiedenen Tierarten, beispielsweise Mäusen, und lagern sich bei der Inkubation mit den Proben an das nachzuweisende Epitop (Antikörperbindungsstelle, z.B. Protein) an. Bei der in der Auswertung angewendeten indirekten Methode wird in einem nächsten Schritt ein zweiter peroxidasegekoppelter Antikörper gegen die Immunglobuline der Tierart des ersten AKs zugegeben. Durch die, am zweiten AK gekoppelte Peroxidase wird anschließend durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine Farbreaktion (rot-braune Verfärbung) hervorgerufen. So lässt sich anhand der Farbreaktion die Anwesenheit sowie die Lokalisationen des gesuchten Proteins nachweisen. [110]

In der Auswertung wurden Färbungen zum Nachweis von CD31, TE-7, VE-Cadherin, SMC-Myosin, Fibronectin, Collagen IV, Connexin-43, α -Actin sowie ICAM und VCAM angefertigt. Als Nachweis und zur Identifizierung der Zellen wurden die zellspezifischen AK CD31 (ECs-AK), TE-7 (FBs-AK), SMC-Myosin / α -Actin (AK gegen glatte Muskelzellen) verwendet. VE-Cadherin, Connexin-43, ICAM und VCAM zeigen als sogenannte Zelladhäsionsmoleküle die Stärke der Verbindungen von Zellen untereinander. Zum Nachweis einer extrazellulären Matrix dienen die AK gegen Fibronectin sowie Collagen IV.

6.2.2 Probengewinnung

Die Proben wurden zu definierten Zeitpunkten (Tabelle 5-4; Zeitplan zur Probenentnahme) genommen und zur Fixierung in 4%ige Formalinlösung gelegt. Damit eine ausreichende Fixierung sichergestellt war, musste eine Zeitspanne von mindestens drei Tagen bis zur Weiterverarbeitung eingehalten werden.

6.2.3 Zellkultur

Zur Gewinnung einer Nativprobe wurde aus den verschiedenen Zellkulturen jeweils eine Probe zur immunhistochemischen Auswertung genommen. Hierfür wurde nach

einem Trypsiniervorgang (5.1.2) eine geringe Menge Zellen in einen „8-well chamber-slide“ gegeben. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger weiter kultiviert. Nachdem eine konfluente Zellschicht den Boden des Objektträgers bedeckte, wurden die Zellen mit gekühltem (-80°C) Ethanol fixiert und bis zur Färbeprozedur im Ultra-Tiefkühlschrank gelagert.

6.2.4 Paraffinschnitte

Um die gewonnenen Proben färben und mikroskopisch beurteilen zu können, mussten Paraffinschnitte angefertigt werden. Hierfür wurden die fixierten Probenstücke in flüssiges Paraffin gegossen. Nach dem Aushärten konnten die Paraffinblöcke mit einem Mikrotom geschnitten werden. Die Schnitte wurden dafür mit einer Dicke von 8 µm (Homograft) und 10 µm (Polyurethanprobe) aus der Probenmitte genommen und anschließend auf Objektträger aufgebracht.

6.2.5 Färbung

Da Proben durch die Einbettung in Paraffin hydrophobe Eigenschaften annehmen, mussten sie zunächst „entparaffiniert“ werden. Hierfür wurden die Schnitte für 10 Minuten in Xylol gewaschen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (90%, 80% und 70%) für jeweils 10 Minuten inkubiert. Zum Entfernen des restlichen Alkohols sind die Proben danach in *aqua destillata* (AD) gewaschen und abschließend in PBS gepuffert worden.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden zunächst die Zellmembranen mit Hilfe des Detergens Triton-X (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D; 0,5% in PBS) permeabel gemacht, gefolgt von Waschgängen in AD und PBS. Bei den Proben zum Nachweis von Collagen-IV, Fibronectin, SMC-Myosin, VE-Cadherin und Connexin-43 musste anschließend eine fünf- bis zehnminütige Proteolyse mittels Protease durchgeführt werden. Waschgänge in AD und PBS folgten.

Durch die Fixierung mittels Formalinlösung wurden verschiedene Epitope denaturiert. Um die Bindungsstellen der Antikörper herzustellen, mussten diese im folgenden Schritt „demaskiert“ werden. Dafür wurden die Proben für 10-15 Minuten gekocht: Die Proben zum α -Actin-Nachweis bei einem pH von 9, die zum Nachweis von ICAM, VCAM und TE-7 bei einem pH von 8 in einer EDTA-Lösung. Für die Proben zum Nachweis von

Connexin-43, VE-Cadherin, SMC-Myosin und CD31 wurde bei pH 6 eine „Target Retrieval-Lösung“ verwendet.

Zur Inkubation mit dem ersten AK wurden diese nach Herstellerangaben verdünnt und mit den Proben für 16-20 Stunden bei 4°C gelagert. Es folgte eine Spülung mit PBS. Der zweite peroxidasegekoppelte AK wurde anschließend für 30 Minuten auf die Objektträger gegeben. Auch hier folgte ein Spülvorgang mit PBS. Zur Visualisierung der AK-Komplexe und damit der gesuchten Struktur wurde eine wässrige, gepufferte Lösung mit Farbsubstrat und Wasserstoffperoxid hergestellt und zur Benetzung der Proben verwendet. Abschließend folgten eine Spülung mit Leitungswasser, die Kernfärbung mittels Hämalaun (färbt Zellkerne blau-lila) und das Eindecken der Objektträger.

Tabelle 6-1; Ablauf der Färbeprozesse

CD 31	α -Actin	TE-7	VCAM	ICAM	VE-Cadheri	SMC-MYosin	Connexi n-43	Collagen -IV	Fibrone ctin
Entparaffinieren									
Permeabilisierung der Zellmembranen									
					Proteolyse				
Demaskierung: 10-15 min									
pH 6	pH 9	pH 8	pH 8	pH 8	pH 6	pH 6	pH 6		
Inkubation 1. AK: 16-20 h									
Inkubation 2. AK: 30 min									
Visualisierung der AK-Komplexe									
Hämalaunfärbung									

6.3 Quantitative rt-PCR

6.3.1 Allgemeines

Die Proteinsyntheseaktivitätsveränderungen einer Zelle lassen sich quantitativ anhand der momentan intrazellulär vorliegenden mRNA-Menge bzw. des mRNA-Konzentrationsverhältnisses bestimmen. Nach einer Umschreibung zu cDNA und Amplifizierung mittels PCR lassen sich, durch das Verhältnis zu Transkriptionsprodukten mit gleich bleibender Syntheserate, beispielsweise GAPDH, die Expressionsveränderungen der zu untersuchenden Parameter im zeitlichen Verlauf bestimmen.

Als Detektionsverfahren stehen zwei Methoden zur Verfügung, die Taqman- und die SYBR-Green-Methode. Für die Auswertung der Versuche wurde die SYBR-Green-Methode verwendet. Hierbei wird ein spezieller Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser kann sich in doppelsträngiger DNA ablagern und dann bei Bestrahlung mit blauem Licht (Wellenlänge $\lambda_{\max}= 494$) bzw. grünes Licht (Wellenlänge $\lambda_{\max}= 521$) emittieren. [111]

Bei der Messung wird die Stärke der gemessenen Fluoreszenz nun gegen die Anzahl an Replikationszyklen aufgetragen. Im Idealfall (Effizienz = 2) sollte die erhaltene Kurve durch die zyklische DNA-Verdopplung zunächst exponentiell ansteigen, durch den irgendwann auftretenden Mangel an Edukten dann jedoch wieder abflachen. An einem bestimmten Zeitpunkt der rt-PCR ist die Menge an synthetisierter (Doppelstrang-) DNA nun so groß, dass die dadurch emittierte SYBR-Green-Fluoreszenz einen festgelegten Wert (Threshold) überschreitet. Dann schneidet die beschriebene Messkurve den Threshold. Dieser Schnittpunkt gleicht einer bestimmten Anzahl an Replikationszyklen und wird als sogenannter Ct-Wert (Ct = cross threshold) für die Berechnung der DNA-Menge/Mengenänderung verwendet. [112, 113]

Für die Auswertung der im Versuch gewonnenen Proben wurden die Parameter IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM gemessen. GAPDH wurde als so genanntes „Haushaltsgen“ zur Verhältnisbestimmung der anderen Parameter ebenfalls mitbestimmt. Bei einem „housekeeping gene bzw. Haushaltsgen“ nimmt man eine gleichbleibende Synthese und damit Konzentration in der Zelle an. So lassen sich durch das Verhältnis zu anderen Parametern Veränderungen in deren zeitlicher Syntheseaktivität bestimmen. [114, 115]

Die Peptidhormone IL-1a, IL-6 und IL-8 sind Interleukine und spiegeln die inflammatorische Zellantwort wieder. Dem Interleukin IL-8 werden jedoch auch neo-

angiogenetische, pro-proliferative und anti-apoptotische Wirkungen zugeschrieben. Das Chemokin MCP-1 ist für die Chemotaxis von Zellen verantwortlich und lässt ebenfalls Rückschlüsse auf die inflammatorische Zellantwort zu. VCAM (vascular cell adhesion molecule) ist ein so genanntes Integrin, also ein in der Zellmembran verankertes Glykoprotein. Es spielt bei der Zelladhäsion zu immunkompetenten Zellen (z.B. Lymphozyten) eine entscheidende Rolle.[116-120]

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die rt-PCR eine so genannte Schmelzkurve gemessen und danach eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Bei der Messung der Schmelzkurve macht man sich die Eigenschaft zu nutze, dass zur Teilung unterschiedlich langer doppelsträngige DNA-Fragmente in zwei Einzelstränge unterschiedliche Energiemengen benötigt werden. Dies liegt an der unterschiedlichen Anzahl von Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen, welche im Separationsprozess zerstört werden. So lässt sich durch kontinuierliches Messen der SYBR-Green-Fluoreszenz bei einem konstanten Temperaturanstieg die Temperaturgrenze bestimmen, ab welcher einzelsträngige DNA vorliegt. Die Fluoreszenz gegen die Temperatur in einer Kurve aufgetragen nennt man Schmelzkurve. Da jedes PCR-Produkt seine eigene, typische Schmelzkurve mit einer spezifischen Schwelle im Verlauf der Kurve besitzt, lassen sich auf diese Weise Fehler im PCR-Versuchsablauf nachweisen. Anhand des Kurvenverlaufs lässt sich so die Spezifität des PCR-Laufes nachweisen und durch die Höhe des Peaks die Menge des gebildeten Fragments annäherungsweise bestimmen. [121]

In der Gel-Elektrophorese werden die erhaltenen PCR-Produkte nach ihrer Ladung und nach ihrer Länge aufgeteilt. Stark geladene und/oder kurze Fragmente wandern weit, wenig geladene und/oder lange Fragmente wandern nur kurze Strecken. So können die Laufstrecken der Standard-Fragmente in Relation zu denen der Proben gesetzt werden. Anhand dieses Verhältnisses konnten die Fragmentlängen der synthetisierten Proben optisch bewertet werden. [122]

Alle für die rt-PCR notwendigen Schritte wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

6.3.2 Probengewinnung und Lagerung

Die gewonnenen Proben (Tabelle 5-4; Zeitplan zur Probenentnahme) wurden zur Lagerung in Kryotubes überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Proben so problemlos bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

6.3.3 RNA-Isolierung

Unter Zuhilfenahme eines RNA-Isolations-Kits (Rneasy Plus Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, D) konnte die Isolation gemäß Herstelleranleitung an den zuvor noch tiefgefrorenen Proben durchgeführt werden. Zur Gewinnung der intrazellulären mRNA musste zunächst eine Lyse der Zellstruktur bzw. der Zellmembranen mittels eines speziellen Lysepuffers und β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich GmbH) im Mischungsverhältnis 100:1 durchgeführt werden. Durch verschiedene Waschschrte wurde die mRNA gereinigt und von anderen Zellbestandteilen und -Fragmenten separiert. Abschließend konnte die gereinigte mRNA in Wasser verdünnt eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

6.3.4 Reverse Transkription

Um verwertbare rt-PCR Ergebnisse zu generieren, war es nötig, die reverse Transkription und die darauf folgende PCR bei jeder Probe jeweils mit einer genau definierten Menge mRNA bzw. cDNA durchzuführen. Dafür musste nach der mRNA-Isolation zunächst mit Hilfe eines Absorbtionsspektrometers ihre Konzentration bestimmt werden. Anhand eines Absorbtionsverhältnisses ($\lambda_{\text{max}}= 260 / \lambda_{\text{max}}= 280$) konnte zusätzlich die Reinheit der mRNA bestimmt werden.

Zur Umschreibung wurden dann genau 700 ng mRNA verwendet. Dabei wurde zunächst die mRNA für 2 Minuten zur Eliminierung restlicher DNA mit einem speziellen Puffer (g-DNA-wipeout-Buffer) bei 95°C inkubiert. Für die Umschreibung wurde im Anschluss mRNA mit Reverser Transkriptase, Primern sowie mit einer Nukleotidlösung (QuantiTect Reverse Transcription Kit; Qiagen GmbH) gemischt und für 15 Minuten bei 95°C inkubiert.

6.3.5 rt-PCR

Für einen PCR-Ansatz wurde cDNA mit Nukleotiden, DNA-Polymerase (SYBR-Green PCR Kit; Qiagen GmbH) und einer, für den zu untersuchenden Parameter spezifischen Primerlösung gemischt und für 35 Zyklen amplifiziert. Ein solcher Zyklus bestand aus einer Denaturierungsphase bei 95°C (10 Sek.), um die DNA-Doppelstränge zu separieren und aus der Synthesephase bei 60°C (30 Sek.), in welcher durch die DNA-Polymerase ein zweiter komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden konnte (Abb 6-1: C). Die Menge an cDNA pro PCR-Reaktionsgefäß wurde anhand der Resultate und Evaluation früherer Versuche auf 55,5 ng festgelegt. Die optimale Primerkonzentration konnte mittels einer vorher angefertigten Standardkurve festgelegt werden. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) der Primer angefertigt und mit dieser ein PCR-Ansatz gemessen (siehe Anhang: 3. Standardkurven der rt-PCR).

Während eines PCR-Laufes wurde nun die Mengenänderung der Doppelstrang-DNA anhand der SYBR-Green-Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet (Abb. 6-1: A). Es wurde sowohl ein Thresholdwert von 0,6 festgelegt, als auch, dass bei $C_t > 1$ der jeweiligen Doppelwerte einer Probe, die Messung wiederholt wird.

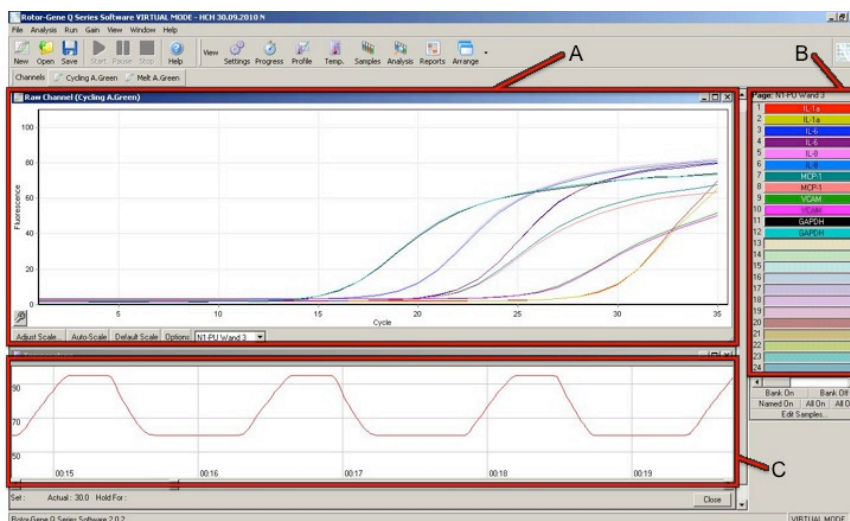


Abbildung 6-1; „Screenshot“ der „Rotor-Gene Q Series“ Software zur Planung, Durchführung und Auswertung der PCR-Läufe; A: Darstellung der emittierten SYBR-Green-Fluoreszenz gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen; B: Kennzeichnung der untersuchten Proben; C: Reaktionskammertemperatur im zeitlichen Verlauf.

6.3.6 Schmelzkurve

Im Anschluss an jede rt-PCR wurde eine Schmelzkurve bestimmt. Hierbei wurde die Temperatur, ausgehend von 60 °C, langsam auf 90 °C erhöht. Die Steigung betrug +1 °C alle 10 Sekunden. Während dieses Temperaturanstieges wurde die Fluoreszenz des SYBR-Green-Farbstoffes gemessen. Nach Darstellung gegen die jeweilige Temperatur konnte so eine entsprechende (Schmelz-)Kurve erstellt werden.

6.3.7 Gel-Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die PCR-Produkte (2 µl) mit einem „Loading Buffer“ (1 µl) gemischt und mit Wasser (3 µl) verdünnt. Die Lösungen wurden anschließend in die vorgesehenen Taschen der Gel-Kassetten gegeben. Als Auswertungshilfe wurde zusätzlich ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Länge (Norm-Fragmente) in zwei extra Taschen gegeben.

An die Gel-Kassette wurde nun für 4 Minuten eine Spannung von 175 V angelegt. Danach konnte unter UV-Licht das durch die Wanderung der DNA-Fragmente hervorgerufene Bandenmuster dokumentiert werden.

7 Ergebnisse

7.1 Rasterelektronenmikroskopie

7.1.1 Nativgewebe

Die Nativproben der Polyurethanklappenscaffolds zeigen ein homogenes, spinnenwebartiges Muster der gesprühten Fasern. Diese weisen keinerlei bestimmte Richtung oder Anordnung auf und variieren nur minimal in ihrem Durchmesser. Die Oberfläche ist insgesamt gleichmäßig strukturiert (Abb 7-1; A).

Die Oberfläche der unbeschichteten Proben der Homografts stellt sich relativ glatt dar. Insgesamt jedoch erscheinen die Proben eher inhomogen. Wellenförmige Furchen und eine faserige Struktur charakterisieren die unbesiedelte Oberfläche (Abb 7-1; B). Wie im Wandanschnitt einer Probe zu sehen ist, bestimmt diese faserige Struktur den gesamten Wandaufbau (Abb 7-1; D: weiße Pfeile).

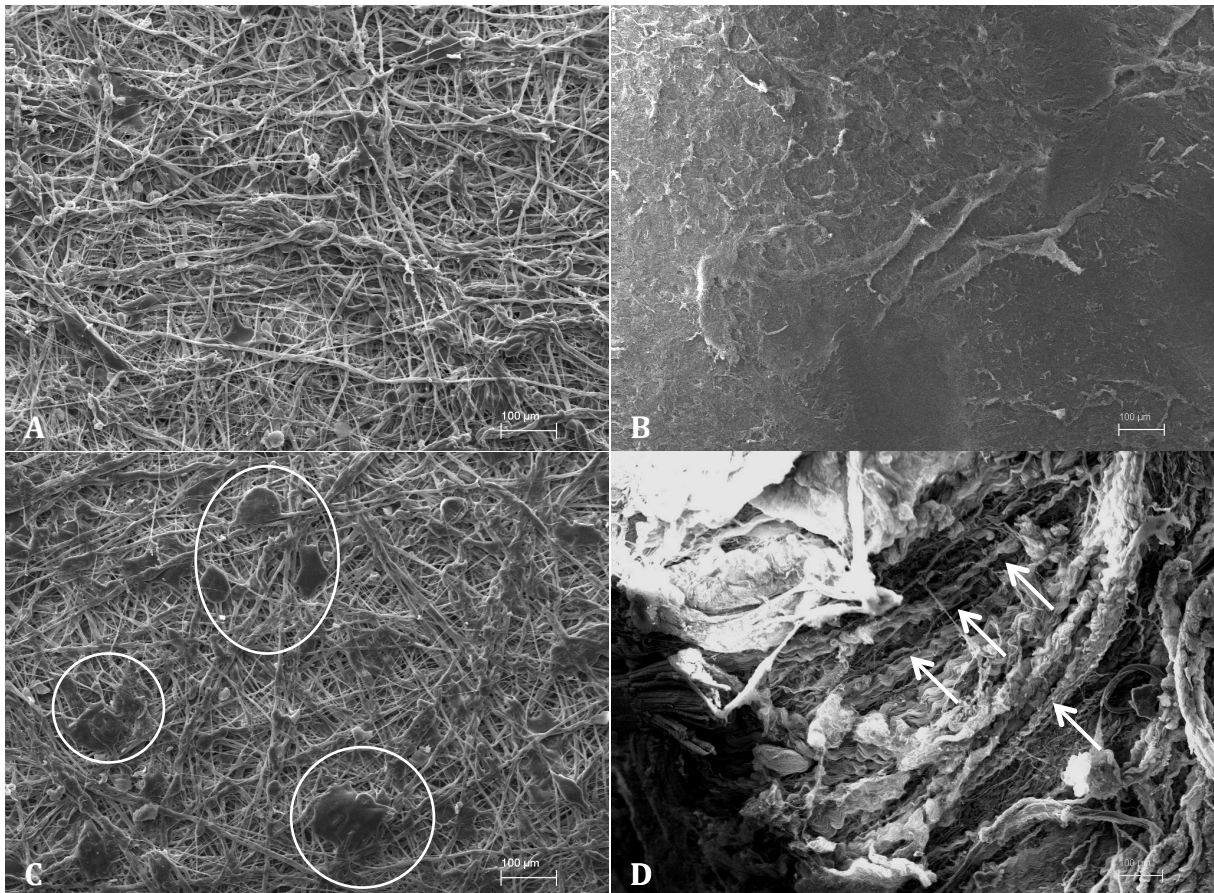


Abbildung 7-1; Repräsentative Nativproben der Herzklappengerüste (Scaffolds): Die Polyurethanklappenscaffolds zeigen ihre typische spinnwebartige, ungeordnete Oberfläche (Bild A); An einigen Stellen sind jedoch sogenannte „Schmelzpunkte“, welche im Herstellungsprozess entstehen können, zu erkennen (Bild C: weiße Kreise); Die Oberfläche der Homografts erscheint insgesamt relativ glatt (Bild B); Im Wandanschnitt ist allerdings der faserige und geschichtete Aufbau der Probe gut zu erkennen (Bild D: weiße Pfeile).

7.1.2 Zellbesiedelung

Die Polyurethangerüste zeigen sich nach der FB-Beschichtung durchgehend von einer konfluenten Zellschicht überzogen. Vereinzelt schimmert die Gewebestruktur der HK zwischen den Zellen noch etwas durch. Die Zellen erscheinen sehr gleichmäßig über die Klappenoberfläche verteilt, und es sind keine Zellagglomerate nach zu weisen. Die typische und spindelförmige Form der FBs ist an vielen Stellen sehr gut erkennbar (Abb 7-2; A).

Auch auf den Homografts kann nach der FB-Beschichtung eine konfluente Zellschicht dokumentiert werden. Im Vergleich zu den Nativproben wirkt die Oberfläche glatter und gleichmäßiger. Furchen und Fasern sind nicht mehr zu erkennen. Ebenfalls sind die Zellen gleichmäßig über den Zellträger verteilt, sehr vereinzelt sind jedoch auch einige Zellagglomerate zu erkennen. Auch in dieser Versuchsgruppe sind die Zellen an ihrer typischen Morphologie zu identifizieren (Abb 7-2; B).

Nach der EC-Beschichtung zeigen sich die Polyurethangerüste immer noch von einer gleichmäßigen und konfluenten Zellschicht überzogen. Die Präsenz von EC lässt sich am Wechsel der Oberflächenstruktur eindeutig erkennen. Die spindelförmige Morphologie der FB ist verschwunden, stattdessen überzieht die Oberfläche ein EC-typisches Pflastersteinrelief. Es ist keine räumliche Orientierung der Zellen zu erkennen. Zellagglomerate sind nicht nach zu weisen (Abb 7-2; C). Die Struktur des Kunststoffgewebes ist nur noch an kleinen Rissen zwischen den Zellen erkennbar (Abb 7-2; C: weiße Pfeile). Bei diesen Rissen handelt es sich wahrscheinlich um Trocknungsartefakte der Kritisch-Punkt-Trocknung (Kap. 6.1.4).

Die Aufnahmen der Homograftproben nach der EC-Beschichtung zeigen ebenfalls eine durchgängige EC-Schicht. Auch hier ist das EC-typische pflastersteinartige Relief zu erkennen. Vereinzelt sind allerdings kleinere Risse und Lücken im Zellteppich nach zu weisen (Abb 7-2; D: weiße Pfeile). Zusätzlich kann auch auf den Proben dieser Versuchsgruppe eine räumliche Orientierung der Zellen, sowie die Bildung von Zellagglomeraten ausgeschlossen werden (Abb 7-2; D). Im Anschnitt der Proben ist die faserige Struktur des Homografts noch gut darzustellen.

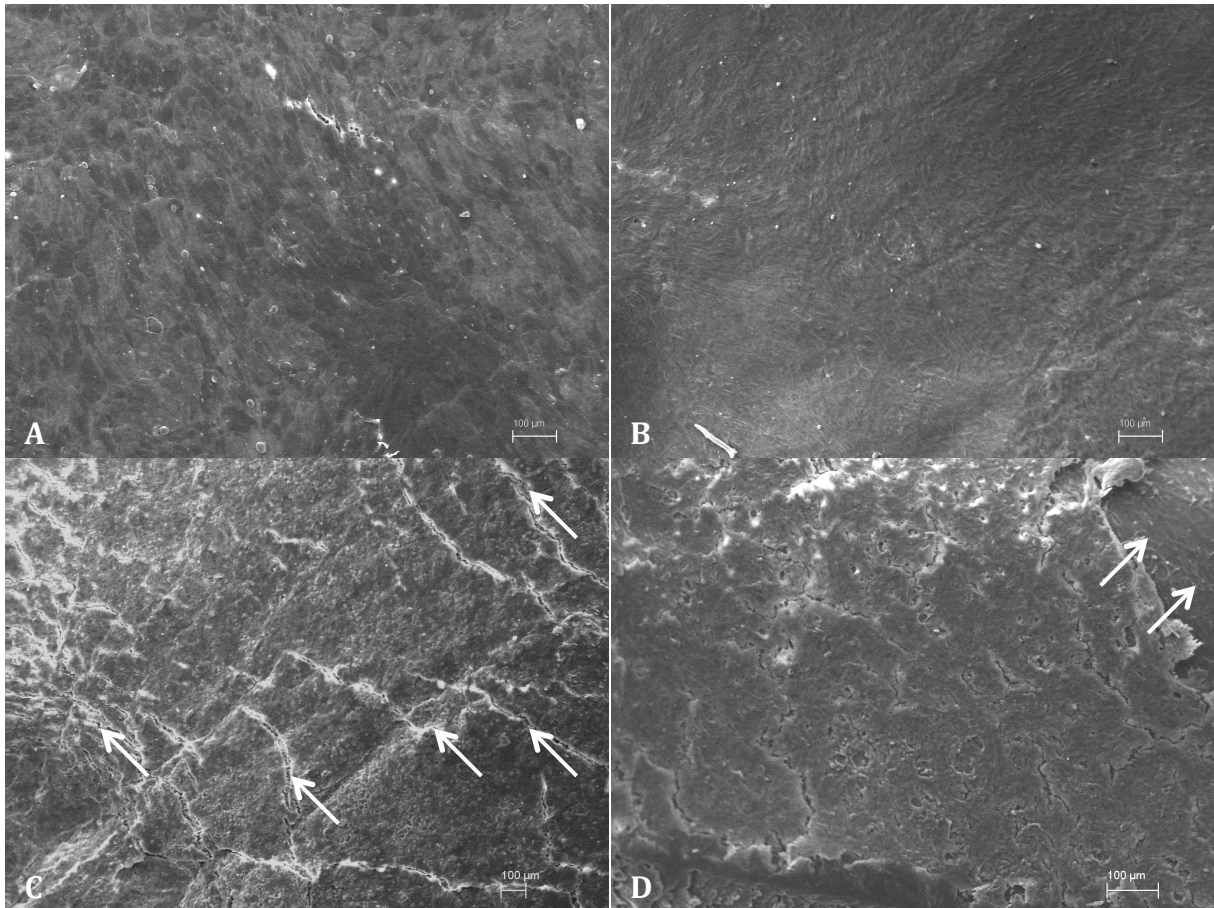


Abbildung 7-2; Repräsentative Proben nach FB- und EC-Besiedelung: Sowohl auf den Polyurethanscaffolds (Bild A) als auch auf den Homografts (Bild B) ist die aufbrachte FB-Schicht gut zu erkennen. Die Zellen sind durch ihre spindelförmige Erscheinung gut zu identifizieren. In der konfluenten Zellschicht ist keine besondere Anordnung oder Ausrichtung zu erkennen. Die erfolgreiche EC-Beschichtung auf Polyurethan (Bild C) und Homograft (Bild D) wird durch das sogenannten Pflastersteinrelief in der konfluenten Zellschicht deutlich. Auch hier ist eine gleichmäßige Verteilung und keine besondere Ausrichtung der Zellen zu erkennen. An vereinzelt Stellen sind allerdings kleine Lücken im Zellteppich nach zu weisen (Bild D: weiße Pfeile). Einige, die Proben durchziehende Risse können als Trocknungsartefakte eingestuft werden (Bild C: weiße Pfeile).

7.1.3 Zellkonditionierung

Im Anschluss an die abschließende Konditionierungsphase können auf den Proben beider Versuchsgruppen konfluente Zellschichten dokumentiert werden (Abb 7-3; A + B). Jedoch erscheint der EC-Teppich auf den Polyurethangerüste insgesamt glatter und vitaler (Abb 7-3; A). Zusätzlich finden sich auf den Homografts vermehrt Zellfragmente angehaftet (Abb 7-3; B: kleine hellgraue Punkte). Zellagglomerate sind nach wie vor auf keiner Probe zu erkennen.

Viele Zellen sind einzeln abgrenzbar, allerdings ist an den meisten Stellen der Herzklappenoberflächen immer noch das EC-typische pflastersteinartige Relief zu sehen. Es lässt sich an einigen Stellen eine flussabhängige Ausrichtung der Zellen (fischschuppenartige Musterung) erkennen (Abb 7-3; C: weiße Pfeile). Besonders an den Herzklappensegeln, welche von einer gleichmäßigen und flächendeckenden Zellschicht überzogen sind, lässt sich dieses Phänomen beobachten.

Auf manchen Homograftproben müssen jedoch auch massive Defekte der Zellschicht dokumentiert werden. So wurde an einer Stelle die frei liegende Wand des Homografts dokumentiert, welche durch ihre faserige Struktur zu identifizieren ist (Abb 7-3; D: weißer Kreis).

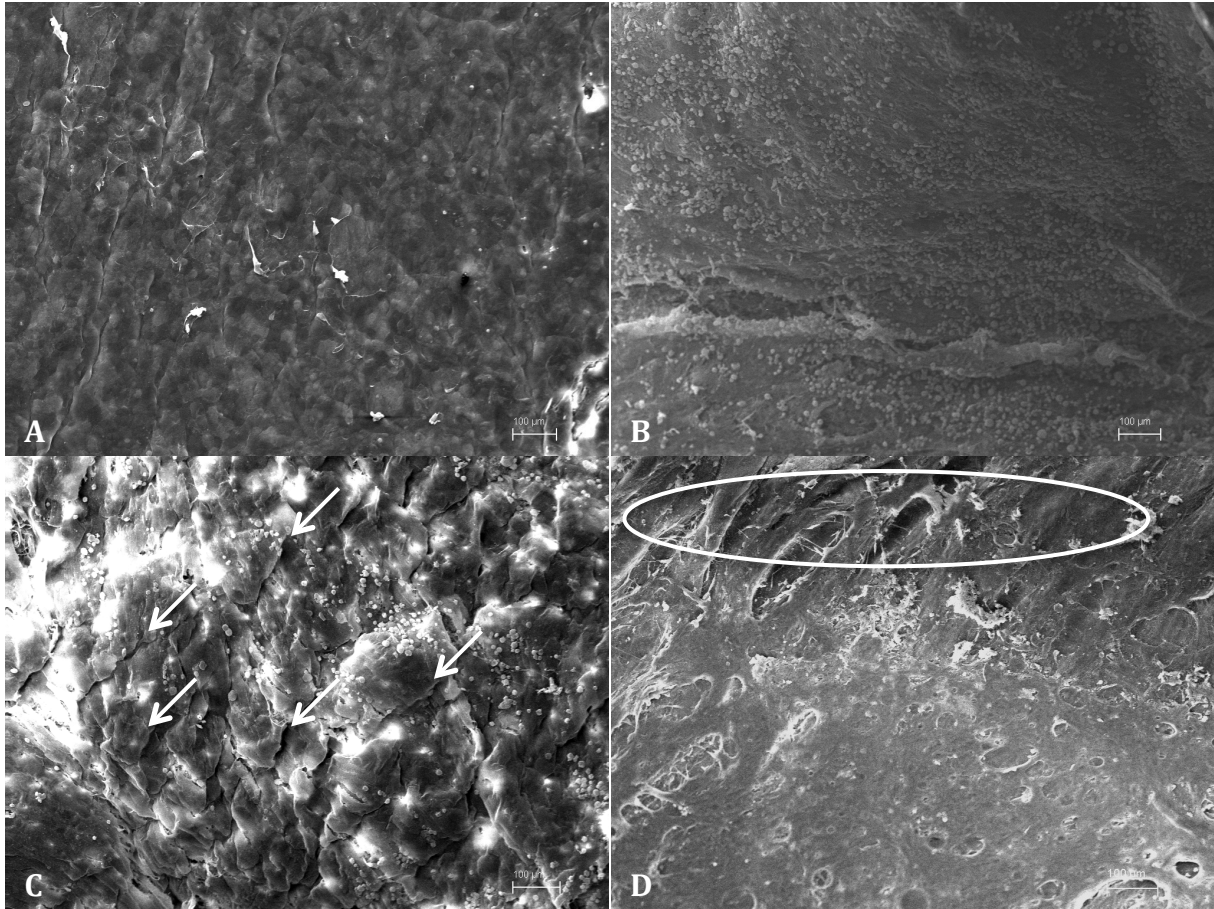


Abbildung 7-3; Repräsentative Proben nach Abschluss der 2. Konditionierungsphase; Konfluente Zellschichten lassen sich sowohl auf den Polyurethan- (Bild A) als auch auf den Homograftproben (Bild B) nachweisen. Insgesamt jedoch erscheint die EC-Schicht auf den Polyurethanscaffolds glatter und vitaler. Auf den Homografts sind außerdem viele Zellfragmente zu sehen (Bild B: kleine graue Punkte). Auf einigen Proben ist eine fischschuppenartige Ausrichtung der Zellen zu erkennen (Bild C: weiße Pfeile). Ein massiver Defekt der Zellschicht reicht bis auf die darunter liegende Homograftwand (Bild D: faserige Struktur, weißer Kreis).

7.1.4 Tabellarische Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse

Tabelle 7-1; Tabellarische Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Analysen mit Klassifizierung nach Anwesenheit und Konfluenz der aufgebrauchten Zellen

	natives Scaffold	Nach FB-Beschichtung	Nach EC-Beschichtung	Nach 2. Konditionierung
Gruppe A	0	FB + / kon. +	EC + / kon. +	EC + / kon. + / f.a.
Gruppe B	0	FB + / kon. +	EC + / kon. -	EC + / kon.-

Legende: 0 = keine Zellen erkennbar, FB + = FB nachweisbar; EC + = EC nachweisbar; kon. - = einzelne Defekte in der konfluenten Zellschicht zu erkennen; kon + = konfluente Zellschicht ohne Defekte zu erkennen; f.a. = flussabhängige Zellausrichtung nachweisbar. Proben mit konfluenter flussausgerichteter Zellschicht grün hinterlegt.

7.2 Immunhistochemische Analyse

7.2.1 Zellkulturen

Die Reinheit der isolierten und kultivierten FB-Zellkulturen konnte mittels positiver Reaktionen auf TE-7- und Fibronectin-, respektive negativer Färbung durch CD31-Antikörper bestätigt werden. Positive Anfärbungen durch CD31- und Connexin-43-, sowie negative Reaktion auf TE-7-Antikörper stellten die EC als Reinkultur dar (siehe Anhang 3).

7.2.2 Nativproben der Homografts

In den Nativproben der Homografts konnte die immunhistochemische Färbung TE-7, SMC-Myosin, α -Actin, Fibronectin, ICAM sowie Collagen IV in der Aortenwand des Homografts nachweisen. Die Stärke der Reaktion und damit die Quantität des nachzuweisenden Antigens variiert zwischen dezenten (SMC-Myosin), moderaten (TE-7 und ICAM) sowie starken (α -Actin, Fibronectin und Collagen IV) Anfärbungen. Eine das Gefäßlumen auskleidende Fibroblasten- und Endothelzellschicht wurde jedoch nicht nachgewiesen (Abb 7-4; A + B). Die ebenfalls durchgeführte Gegenfärbung mit Hämalaun stellt außerdem zahlreiche Zellkerne in der Aorten-/Homograftwand dar. Eine immunhistochemische Färbung von Nativproben der Polyurethangerüste wurde aus oben genannten Gründen (Kap. 5.2.4. Zellkonditionierung) nicht durchgeführt.

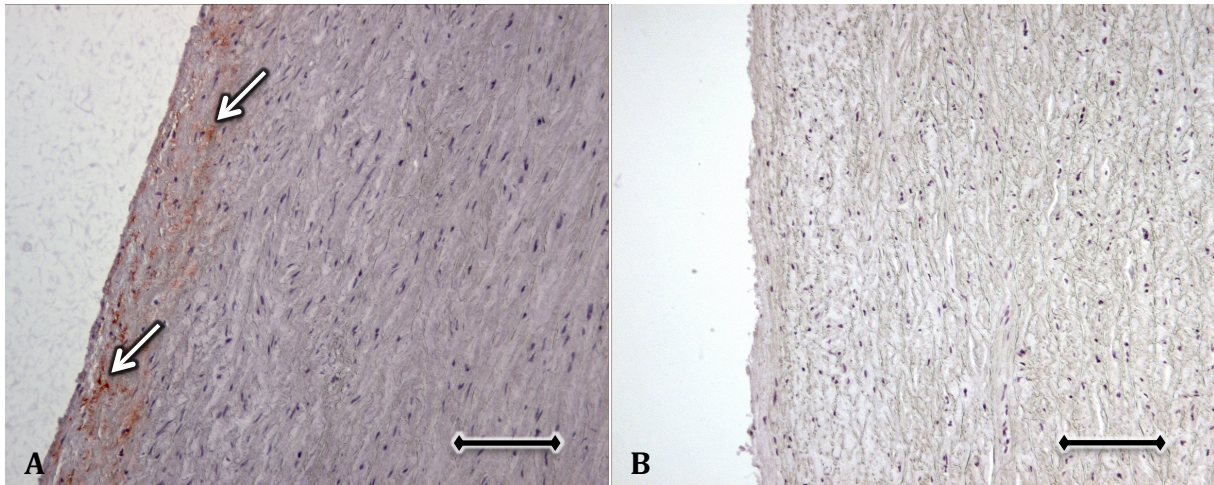


Abbildung 7-4; Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von immunhistochemisch gefärbten Nativproben der Homografts: Die Inkubation mit TE-7-Antikörper zeigt zwar eine leichte positive Reaktion (Bild A: weiße Pfeile), bestätigt aber nicht die Anwesenheit von FBs (Bild A). EC konnten aufgrund der fehlenden Reaktion bei CD31-Antikörpern nicht nachgewiesen werden (Bild B). Mittels Hämalaun konnten in der Aorten-/Homograftwand zahlreiche Zellkerne dargestellt werden. Maßstabsbalken = 100 μm .

7.2.3 Zellbesichtungsnachweis

Bereits ungefärbte Schnitte von Proben beider Versuchsgruppen nach der FB-Besiedelung zeigten unter dem Lichtmikroskop eine Anlagerung von Zellen auf ihrer Oberfläche. Jedoch erst die durchgeführte immunhistochemische Färbung mit AK gegen TE-7 beweist durch rot-braune Farbreaktionen die Anhaftung von FB. Die positiven Farbreaktionen lassen sich über die gesamte Oberfläche der Proben beider Versuchsgruppen nachweisen. Die Stärke der antigennachweisenden Färbungen und die damit verbundene Quantität an Zellen imponiert jedoch auf den Proben der Polyurethangerüste mehr (Abb 7-5; A + B). Die ebenfalls durchgeführten, negativ ausgefallenen Färbungen gegen CD31 und SMC-Myosin bestätigen die Reinheit der FB und schließen eine Verunreinigung durch andere Zelltypen aus. Vereinzelt zeigen sich durch die immunhistochemische Aufarbeitung und Färbung abgelöste und dislozierte Gruppen von Zellen (Abb 7-5; B: schwarzer Kreis).

Nach der zweiten Zellbesiedelungsphase beweist die positive immunhistochemische Anfärbung mit CD31-Antikörpern in beiden Versuchsgruppen die Anwesenheit von EC. Hier stellen sich die angelagerten EC durch einen rot-braun gefärbten oberflächlichen Randsaum auf den Proben dar. Dieser lässt sich über die gesamte dargestellte Oberfläche der Proben beider Versuchsgruppen verfolgen. Jeweils über die gesamten

Proben betrachtet, imponieren auch nach diesem Beschichtungsschritt in Menge und Intensität der Anfärbungen die Proben der Polyurethangerüste (Abb 7-5; C + D). Bedingt durch die Vorbeschichtung mit FB zeigen sich bei den immunhistochemischen Färbungen gegen TE-7 nach der EC-Beschichtung ebenfalls positive Reaktionen. Auch auf den Proben dieses Versuchsschrittes sind in den gefärbten Schnitten einige bearbeitungsbedingte dislozierte Zellgruppen zu erkennen (Abb 7-5; D: schwarze Ellipse).

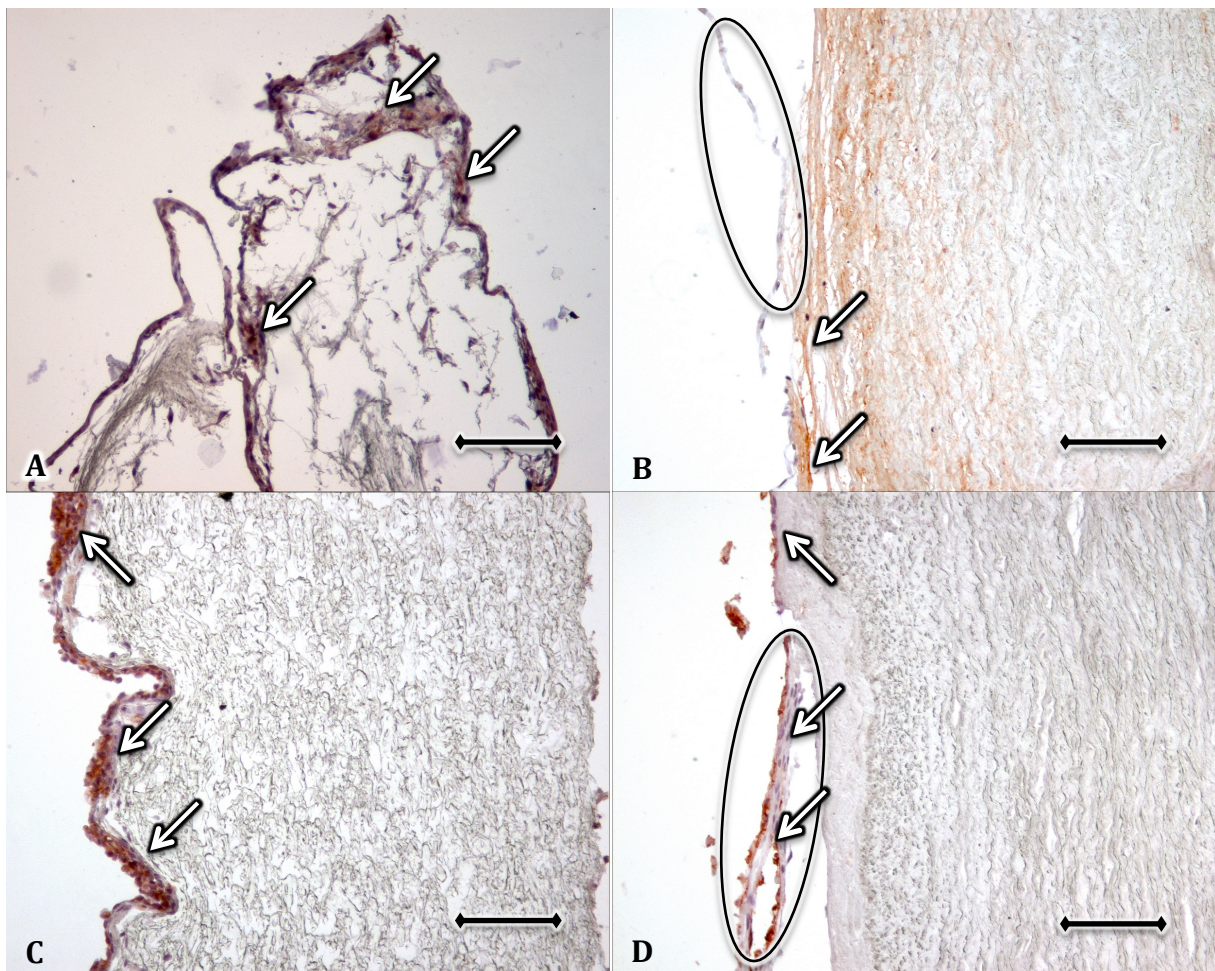


Abbildung 7-5; Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Proben: Die positive Reaktion des Antikörpers gegen TE-7 nach der FB-Beschichtung zeigt den Erfolg der Prozedur. Auf den Polyurethanproben ist ein mehrschichtiger Zellteppich mit positiven TE-7-Reaktionen zu erkennen (Bild A: weiße Pfeile). Eine etwas weniger stark ausgeprägt Reaktion auf TE-7 ist auf den Homograftproben nach zu weisen, jedoch auch hier wird die erfolgreiche FB-Beschichtung bestätigt (Bild B: weiße Pfeile). Nach der EC-Beschichtung bestätigen starke positive Reaktionen des CD31-Antikörpers auf den Polyurethan- (Bild C: weiße Pfeile) wie auch auf den Homograftproben (Bild D: weiße Pfeile) die EC-Anlagerungen. Teile der beschichteten Zellen sind durch die Aufarbeitung der Proben bedingt etwas von der Probe disloziert (Bild B + D: schwarze Ellipsen); Maßstabsbalken = 100 µm.

7.2.4 Nachweis der extrazellulären Matrix

Bereits nach der ersten Konditionierungsphase können positive Reaktionen bei der immunhistochemischen Färbung gegen Collagen IV sowie Fibronectin als EZM-Nachweis in beiden Gruppen beobachtet werden. Die rot-braunen Anfärbungen sind im Bereich der aufgetragenen FB zu sehen und ziehen sich schwach bis mäßig ausgeprägt entlang der gesamten Probenoberfläche. Insgesamt betrachtet kommen nach der FB-Konditionierung auf den Polyurethanproben jedoch mehr Farbreaktionen zum Vorschein.

Eine deutliche Intensivierung der Farbreaktionen ist auf den Proben beider Versuchsgruppen nach der zweiten Konditionierungsphase zu dokumentieren. Diese verstärkte Reaktion betrifft sowohl die Färbungen gegen Collagen IV (Abb 7-6; A + B) als auch gegen Fibronectin (Abb 7-6; C + D). Die rot-braunen Anfärbungen stellen sich wieder entlang der aufgetragenen Zellen als ein Band entlang des Probenrandes dar. Im Innenbereich des Trägermaterials sind keine Anfärbungen zu sehen. In der Intensität der Farbreaktionen zeigt sich jedoch insgesamt auch nach dieser Konditionierungsphase wieder eine stärkere Ausprägung auf den Polyurethanproben.

Leider konnten aufgrund fehlender Zellen auf zwei Proben keine Anfärbungen nachgewiesen werden. Am ehesten ist dies durch ein verarbeitungsbedingtes Ablösen während des Färbevorgangs zu erklären.

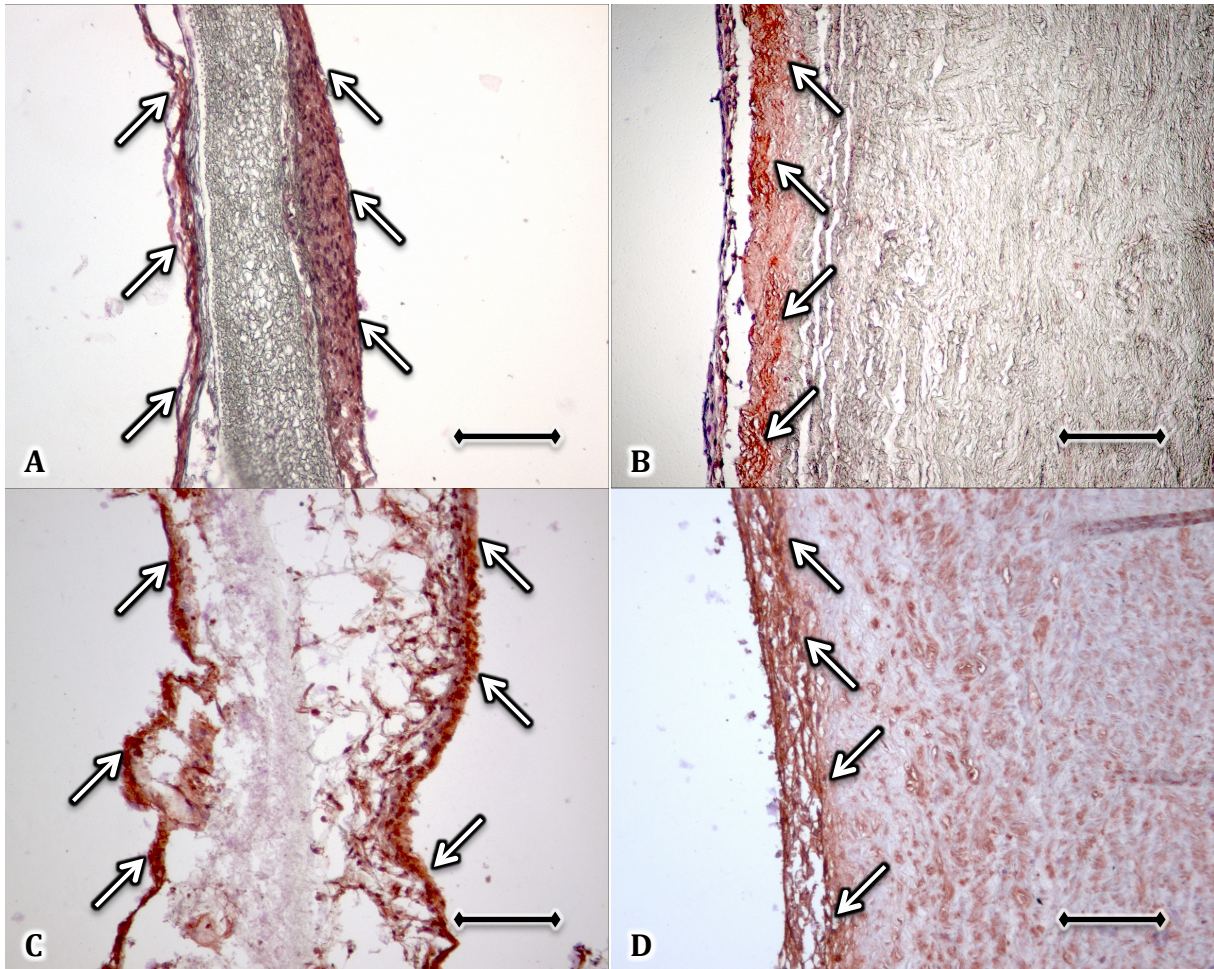


Abbildung 7-6; Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Proben: Starke positive Reaktion des EZM-spezifischen Antikörpers gegen Collagen IV nach Abschluss der Versuche auf den Polyurethan- (Bild A: weiße Pfeile) und Homograftproben (Bild B: weiße Pfeile). Ebenfalls können starke positive Reaktionen des Fibronectin-Antikörpers, ebenfalls EZM-spezifisch, nach der 2. Konditionierungsphase auf den Polyurethanscaffolds (Bild C: weiße Pfeile) und Homografts (Bild D: weiße Pfeile) nachgewiesen werden. Insgesamt jedoch sind die Reaktionen der Antikörper auf den Polyurethanproben stärker ausgeprägt, was für einen erhöhten Gehalt an EZM spricht; Auflockerungen der Proben und Dislokationen der Zellschichten sind durch die Probenaufarbeitung bedingt (Bild B + C); Maßstabsbalken = 100 µm.

7.2.5 Interzelluläre Verbindungen

Die Farbreaktionen bei der immunhistochemischen Färbung gegen Connexin-43 sind in beiden Gruppen auf den Proben der verschiedenen Versuchsabschnitte als äquivalent dezent einzustufen. Eine signifikante Zunahme von Farbreaktionen ist während des gesamten Versuchsablaufs nicht zu erkennen. Auch nach der zweiten Konditionierungsphase lassen sich bloß vereinzelte rot-braune Anfärbungen der aufgetragenen Zellen dokumentieren (Abb 7-7; A + B).

Das typischerweise von EC exprimierte VE-Cadherin zeigt bereits nach der EC-Beschichtung in beiden Versuchsgruppen eindeutige positive Reaktionen. Deutlich verstärkte Farbreaktionen sind jedoch auf den Proben nach der zweiten Konditionierungsphase zu dokumentieren. Diese Anfärbungen sind allerdings auf den Polyurethanproben stärker ausgeprägt. Im Bereich des Trägermaterials der Zellen sind keine Farbreaktionen zu erkennen (Abb 7-7; C + D). Auf einigen Proben sind auch bei dieser Antikörperfärbung verarbeitungsbedingte abgelöste oder aufgelockerte Zellverbände zu sehen.

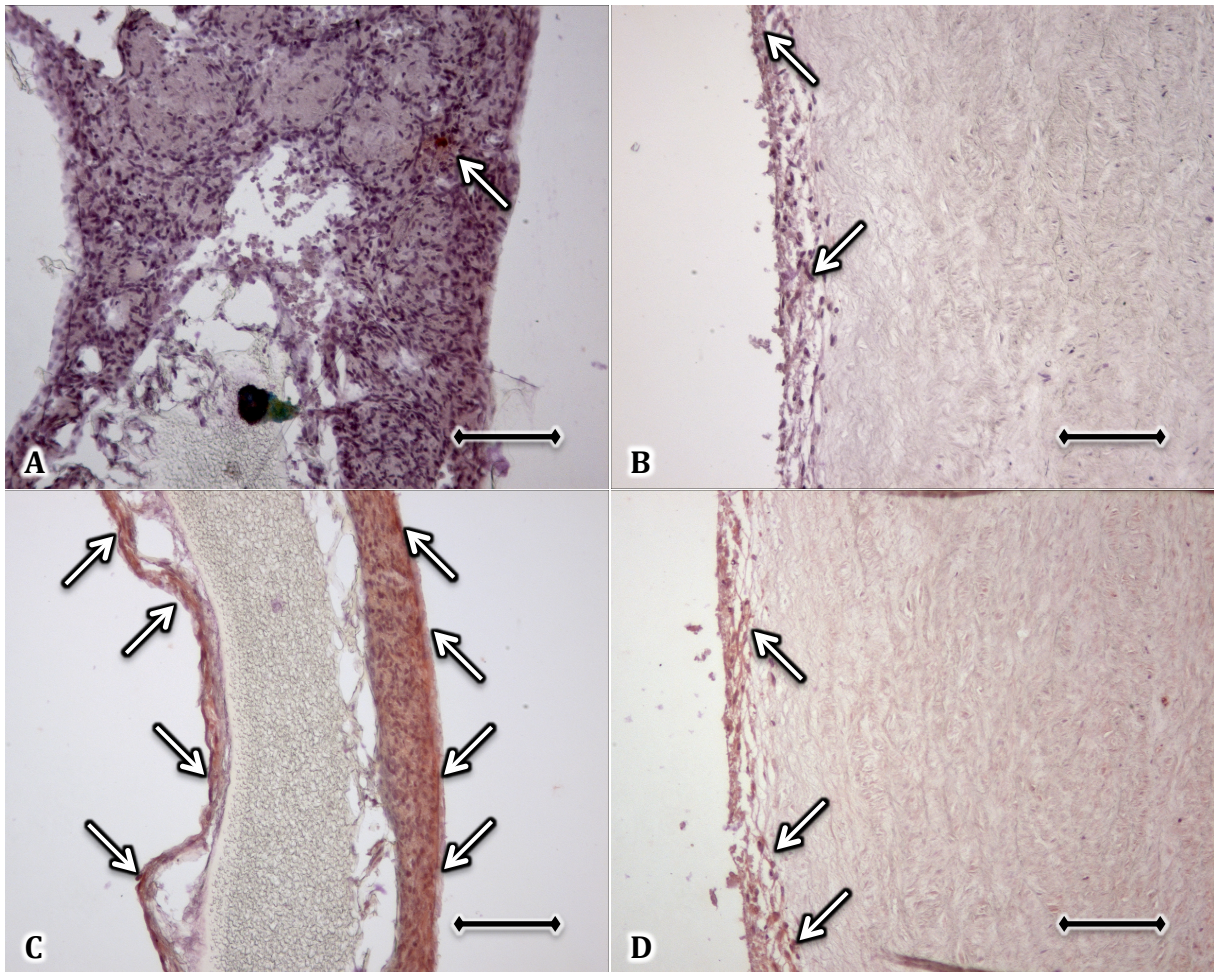


Abbildung 7-7; Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Proben: Bei der Anfärbung gegen Connexin-43 nach der zweiten Konditionierungsphase lassen sich auf den Polyurethan- (Bild A: weiße Pfeile) sowie auf den Homograftproben (Bild B: weiße Pfeile) nur einige vereinzelte Farbreaktionen beobachten. Diese sind im Konglomerat der beschichteten Zellen lokalisiert. Beim immunhistochemischen Nachweis von VE-Cadherin ebenfalls nach Abschluss der Versuche können auf den Polyurethanproben sehr ausgeprägte (Bild C: weiße Pfeile) und auf den Homograftproben etwas weniger starke Farbreaktionen (Bild D: weiße Pfeile) beobachtet werden. Auch hier sind die Farbreaktionen ausschließlich im Randsaum der Proben, an den beschichteten Zellen zu erkennen. Auflockerungen der Proben und Dislokationen der Zellschichten sind durch die Probenaufarbeitung bedingt. Maßstabsbalken = 100 μm .

7.2.6 Immunmodulatorische Zellreaktion

Beim immunhistochemischen Nachweis von VCAM können auf den Proben beider Versuchsgruppen weder nach FB- noch nach EC-Beschichtung positive Reaktionen festgestellt werden. Erst nach der zweiten Konditionierungsphase lassen sich einzelne schwache Farbreaktionen darstellen. Diese sind verstreut in den Polyurethanproben im Zellverband und in den Homograftproben, teilweise auch im Trägermaterial lokalisiert. Unterschiedliche Intensitäten und Mengen der Anfärbungen während des Versuchsablaufs sind im Vergleich beider Versuchsgruppen nicht zu erkennen (Abb 7-8; A + B).

Die Färbung gegen ICAM zeigt in beiden Versuchsgruppen einen kontinuierlichen Zuwachs der Farbreaktion und damit der Expression dieses Zelladhäsionsmoleküls während des Versuchsablaufes. Im Vergleich beider Gruppen zeigt sich jedoch auf den Polyurethanproben immer eine etwas stärkere Anfärbung. Auch nach Abschluss der Versuche stellen sich auf den Proben die starken rot-braunen Anfärbungen als randständiges Band entlang der beschichteten Zellen dar. Im Trägermaterial sind keine Farbreaktionen zu dokumentieren (Abb 7-8; C + D).

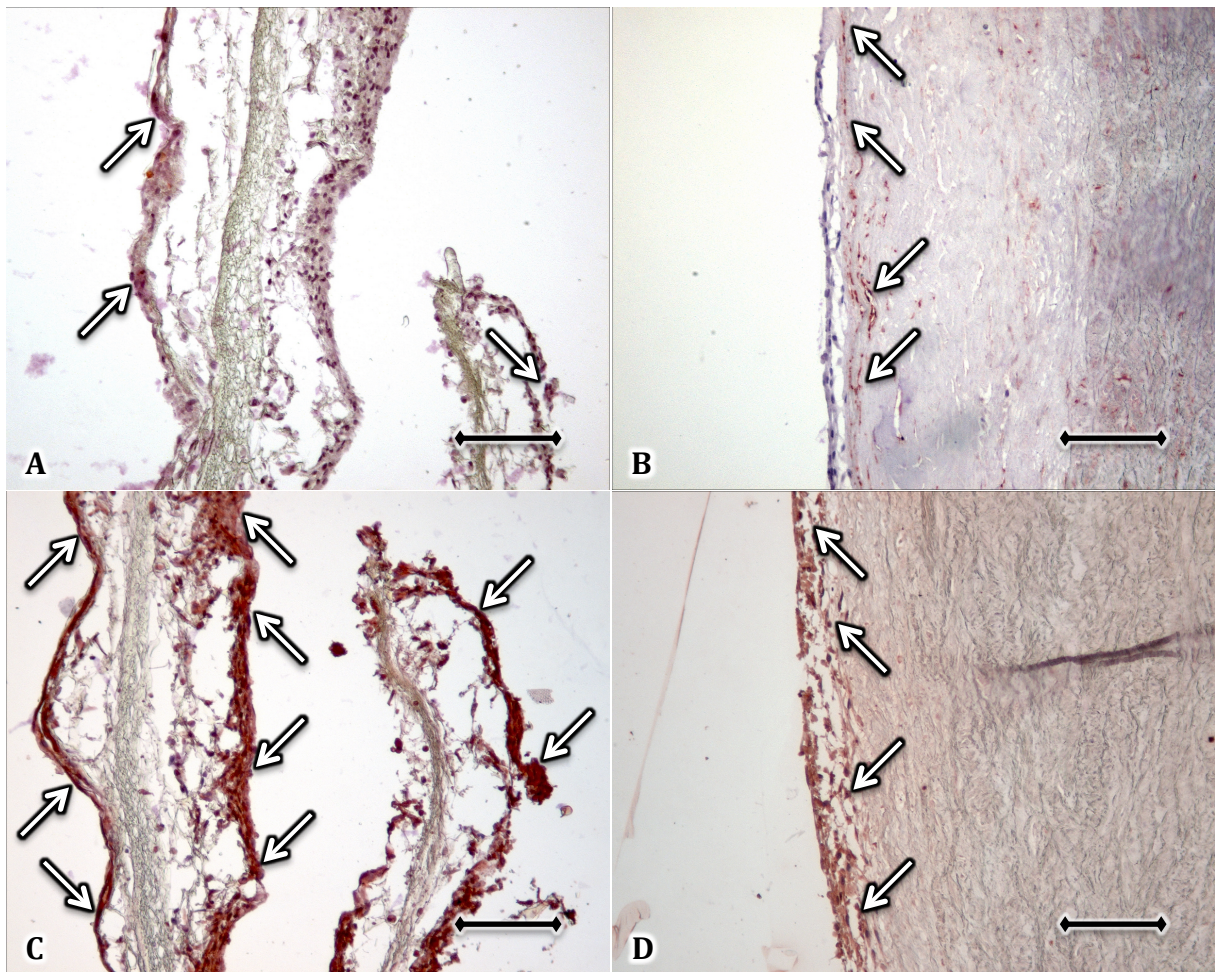


Abbildung 7-8; Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Proben: Nach der zweiten Konditionierungsphase sind beim Nachweis von VCAM nur einige vereinzelte Farbreaktionen zu erkennen. Auf den Polyurethanproben (Bild A: weiße Pfeile) sind dabei etwas weniger rot-braune Anfärbungen als auf denen der Homografts (Bild B: weiße Pfeile) zu dokumentieren. Insgesamt stärkere und vermehrte Anfärbungen imponieren beim Nachweis von ICAM am Ende der Versuche sowohl auf den Polyurethan- (Bild C: weiße Pfeile) als auch auf den Homograftproben (Bild D: weiße Pfeile). Auch hier fanden die Farbreaktionen wieder im Bereich der aufgetragenen Zellen statt. Auflockerungen der Proben und Dislokationen der Zellschichten sind durch die Probenaufarbeitung bedingt. Maßstabsbalken = 100 μm .

7.2.7 Tabellarische Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

Tabelle 7-2; Tabellarische Zusammenfassung der immunhistochemischen Analysen mit Klassifizierung nach Stärke der hervorgerufenen Farbreaktion und damit nach Quantität der nachzuweisenden Antigene

	Zellkultur		natives Scaffold	Nach FB-Beschichtung	Nach EC-Beschichtung	Nach 2. Konditionierung
	EC	FB				
Gruppe A						
CD 31	+++	0	n.d.	0	+++	+++
TE-7	0	+++	n.d.	++	+	+++
SMC-myosin	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0
α -actin	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+++
VE-cadherin	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+++
connexin-43	++	n.d.	n.d.	0	+	+
fibronectin	n.d.	+++	n.d.	+	+	+++
ICAM	n.d.	n.d.	n.d.	+	++	+++
VCAM	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	+
collagen IV	n.d.	++	n.d.	+	++	+++
Gruppe B						
CD 31	+++	0	0	0	++	++
TE-7	0	+++	0*	+	++*	++*
SMC-myosin	n.d.	n.d.	0*	0*	0*	+
α -actin	n.d.	n.d.	0*	+	+	++*
VE-cadherin	n.d.	n.d.	0	0	+	++
connexin-43	++	n.d.	0	+	+	+
fibronectin	n.d.	+++	0*	0*	+	+++*
ICAM	n.d.	n.d.	0*	+	++*	++*
VCAM	n.d.	n.d.	0	0	0*	+
collagen IV	n.d.	++	0*	0*	+	+++*

Legende: 0 = keine Färbung sichtbar, + = dezente Färbung, ++ = moderate Färbung, +++ = starke Färbung (zur besseren Visualisierung grün hinterlegt), n.d. = nicht durchgeführt; (* = positive Reaktion im Scaffoldgewebe).

7.3 PCR

Bei der replikationszyklenabhängigen Aufzeichnung der emittierten SYBR-Green-Fluoreszenz zeigte sich für alle Proben ein sigmoidaler Messkurvenverlauf. Der Schnittpunkt des Threshold lag immer im exponentiellen Teilverlauf der Messkurve. Der Mittelwert der Abweichungen der Doppelmessungen wurde auf $0,07 \pm 0,12$ Ct-Einheiten berechnet. Es konnte kein Anstieg der Messkurve der Leerwerte im beurteilungsrelevanten und sigmoidalen Teil der Probenmesskurven festgestellt werden.

Die nach Abschluss der PCR-Läufe erstellten Schmelzkurven zeigten durchweg einen für den jeweils eingesetzten Primer typischen Verlauf. Die gemessenen Peaks der Fluoreszenzstärke traten bei den entsprechenden Temperaturen auf. Die Höhe der Peaks ließ auf eine erfolgreiche Synthese und eine für die Aussagekraft der Versuche ausreichende Menge an synthetisierten DNA-Fragmenten schließen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Auswertung der Gel-Elektrophorese. Dicke Einzelbanden bestätigten die hohen Mengen an synthetisierter und identischer DNA. Die primerabhängigen Laufstrecken der DNA-Fragmente bestätigten ebenfalls die Spezifität der Replikationsmethode (siehe Anhang: 5. Schmelzkurve; 6. Gel-Elektrophorese).

7.3.1 Effekt der 1. Konditionierungsphase

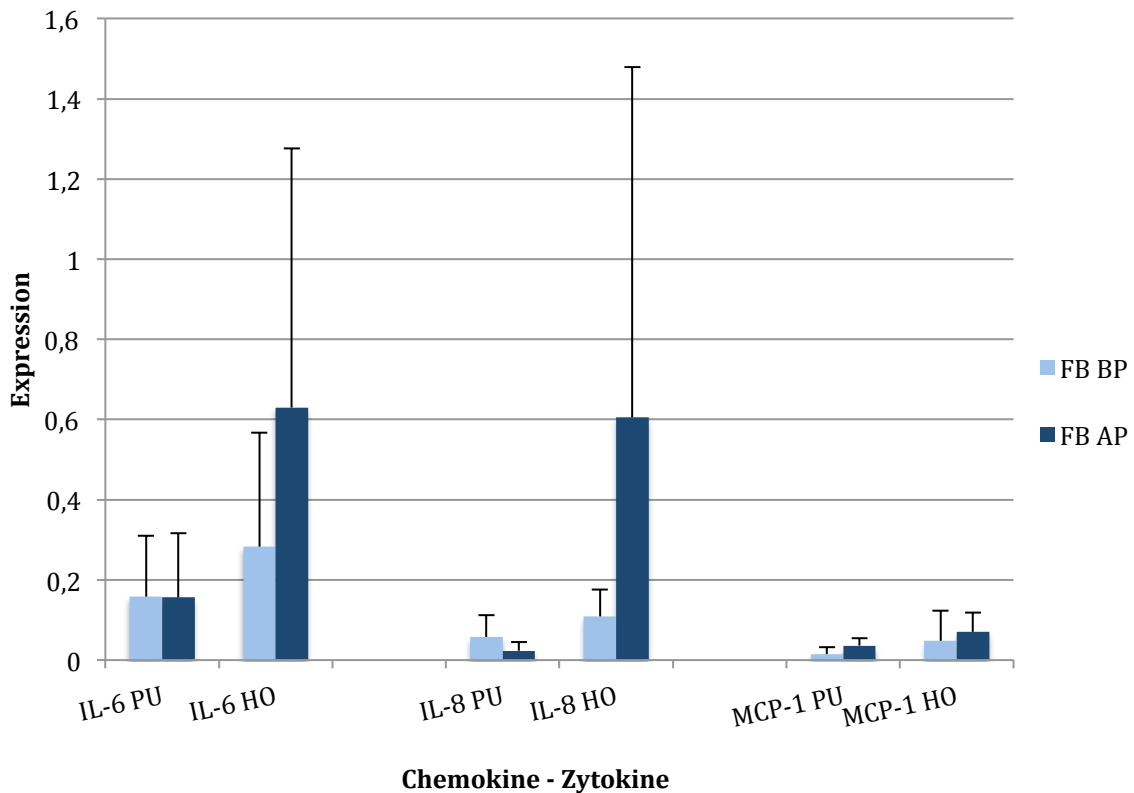
Für die Expression von IL-6, IL-8 und MCP-1 konnten in der Versuchsgruppe A (PU) unterschiedliche Expressionsveränderungen beobachtet werden. So wurde während der ersten Konditionierungsphase für IL-6 keine signifikante Änderung der Genexpression, für IL-8 eine Herunterregulation von -59,48 % und für MCP-1 eine Hochregulation der Expression von + 138,78 % gemessen. In der Versuchsgruppe B (HO) hingegen zeigte sich für alle Parameter eine mäßige bis starke Zunahme der Expressionen in diesem Zeitraum. Die IL-6-Expression stieg um mehr als das Doppelte (+ 122,61%), IL-8 sogar um mehr als das Vierfache (+ 454,38 %), lediglich MCP-1 hatte mit + 45,39 % einen relativ moderaten Anstieg der Genexpression (Grafische Darstellung der Genexpressionen in Diagramm 7-1).

Für IL-1a und VCAM konnte keine signifikante Expression und somit auch keine relevante Expressionsveränderung während der ersten Konditionierungsphase gemessen werden.

Tabelle 7-3; Prozentuale Veränderung der Genexpression von IL-6, IL-8 und MCP-1 in beiden Versuchsgruppen während der ersten Konditionierungsphase

Versuchsgruppe	IL-6	IL-8	MCP-1
PU (A)	- 1,12 %	- 59,48 %	+ 138,78 %
HO (B)	+ 122,61 %	+ 454,38 %	+ 45,39 %

Diagramm 7-1: Darstellung der Genexpressionen von IL-6, IL-8 und MCP-1 vor und nach der ersten Konditionierungsphase:



Legende: FB BP = vor Konditionierung der Fibroblasten; FB AP = nach Konditionierung der Fibroblasten; PU = Versuchsgruppe A; HO = Versuchsgruppe B.

7.3.2 Effekt der EC-Besiedelung auf die Genexpression

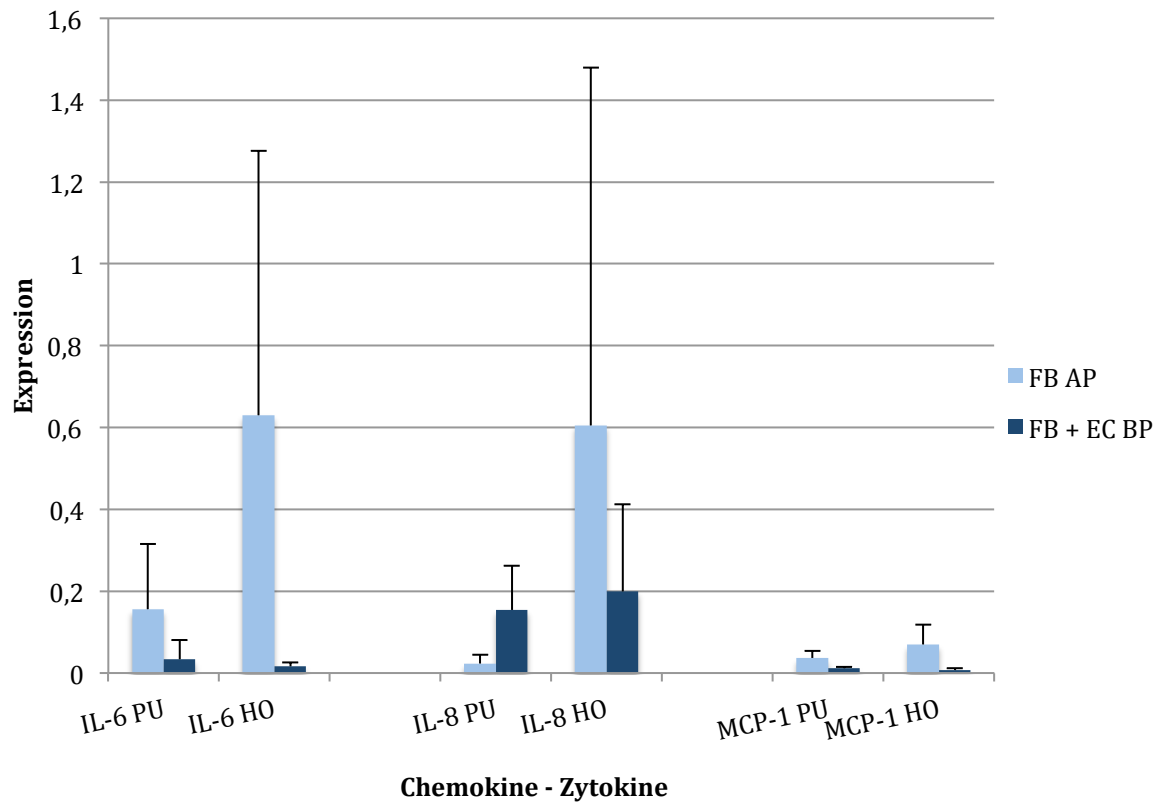
Durch die Endothelialisierung konnte fast ausschließlich eine Herabregulation der Expressionen der pro-inflammatorischen Gene bewirkt werden. Für IL-6 konnte ein Rückgang von - 78,82 % und für MCP-1 von - 68,71 % in Versuchsgruppe A gemessen werden. In Gruppe B gingen die Expressionen von IL-6 um - 97,42 %, von IL-8 um - 67,01% und von MCP-1 um - 89,44 % zurück. Lediglich IL-8 verzeichnete in der Versuchsgruppe A einen Anstieg von + 559,7 % (Grafische Darstellung der Genexpressionen in Diagramm 7-2).

Auch nach der Endothelzellbeschichtung konnte weder für IL-1a noch für VCAM eine signifikante Genexpression nachgewiesen werden. Folglich wurde durch diesen Versuchsschritt auch keine Expressionsveränderung dieser beiden Parameter hervorgerufen.

Tabelle 7-4; Prozentuale Veränderung der Genexpression von IL-6, IL-8 und MCP-1 in beiden Versuchsgruppen durch die Endothelzellbeschichtung

Versuchsgruppe	IL-6	IL-8	MCP-1
PU (A)	- 78,82 %	+ 559,7 %	- 68,71 %
HO (B)	- 97,42 %	- 67,01 %	- 89,44 %

Diagramm 7-2: Darstellung der Genexpressionen von IL-6, IL-8 und MCP-1 vor und nach der Endothelzellbeschichtung:



Legende: FB AP = nach Konditionierung der Fibroblasten; FB + EC BP = nach Endothelzellbeschichtung vor der Konditionierungsphase; PU = Versuchsgruppe A; HO = Versuchsgruppe B.

7.3.3 Effekt der 2. Konditionierungsphase

Die Werte der jeweiligen Zytokine und Chemokine der einzelnen Wandabschnitte und Segel zeigten keine signifikanten Unterschiede nach Abschluss der zweiten Konditionierungsphase. So konnten ihre Werte zur Berechnung und Auswertung der Genexpressionsveränderung zusammengefasst und mit in die Berechnungen einbezogen werden.

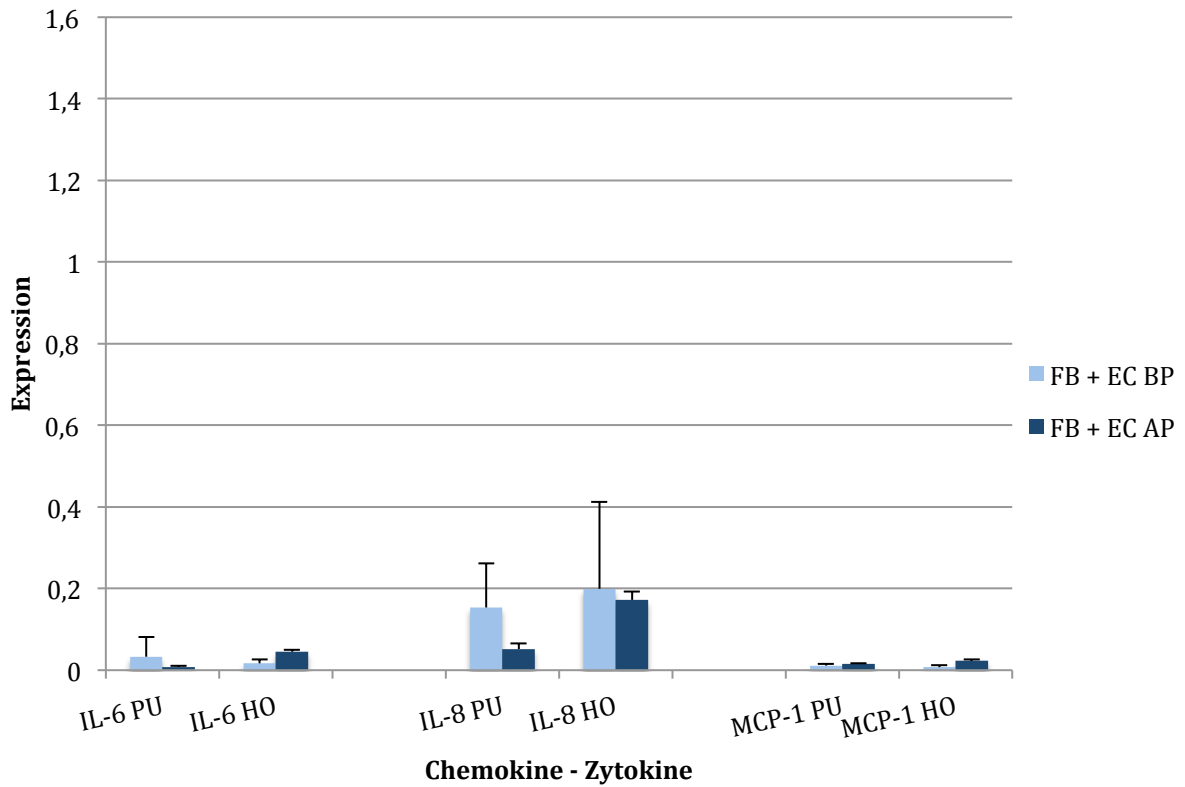
Während der zweiten Konditionierungsphase konnte in beiden Versuchsgruppen eine Herabregulation der Expression von IL-8 gemessen werden. In Versuchsgruppe A in Höhe von - 66,23 % und in Versuchsgruppe B von - 13,98 %. Für IL-6 und MCP-1 konnte in dieser Versuchsphase keine relevante Expression mehr festgestellt werden. Folglich sind auch keine validen Aussagen zur Signifikanz der Genexpressionsveränderung möglich.

Auch in dieser finalen Versuchsphase konnten keine signifikanten Expressionen von IL-1a und VCAM gemessen werden. Somit gab es auch zu diesem Zeitpunkt keine Änderung der Genexpressionen.

Tabelle 7-5; Prozentuale Veränderung der Genexpression von IL-6, IL-8 und MCP-1 in beiden Versuchsgruppen während der zweiten Konditionierungsphase

Versuchsgruppe	IL-6	IL-8	MCP-1
PU (A)	-	- 66,23 %	-
HO (B)	-	- 13,98 %	-

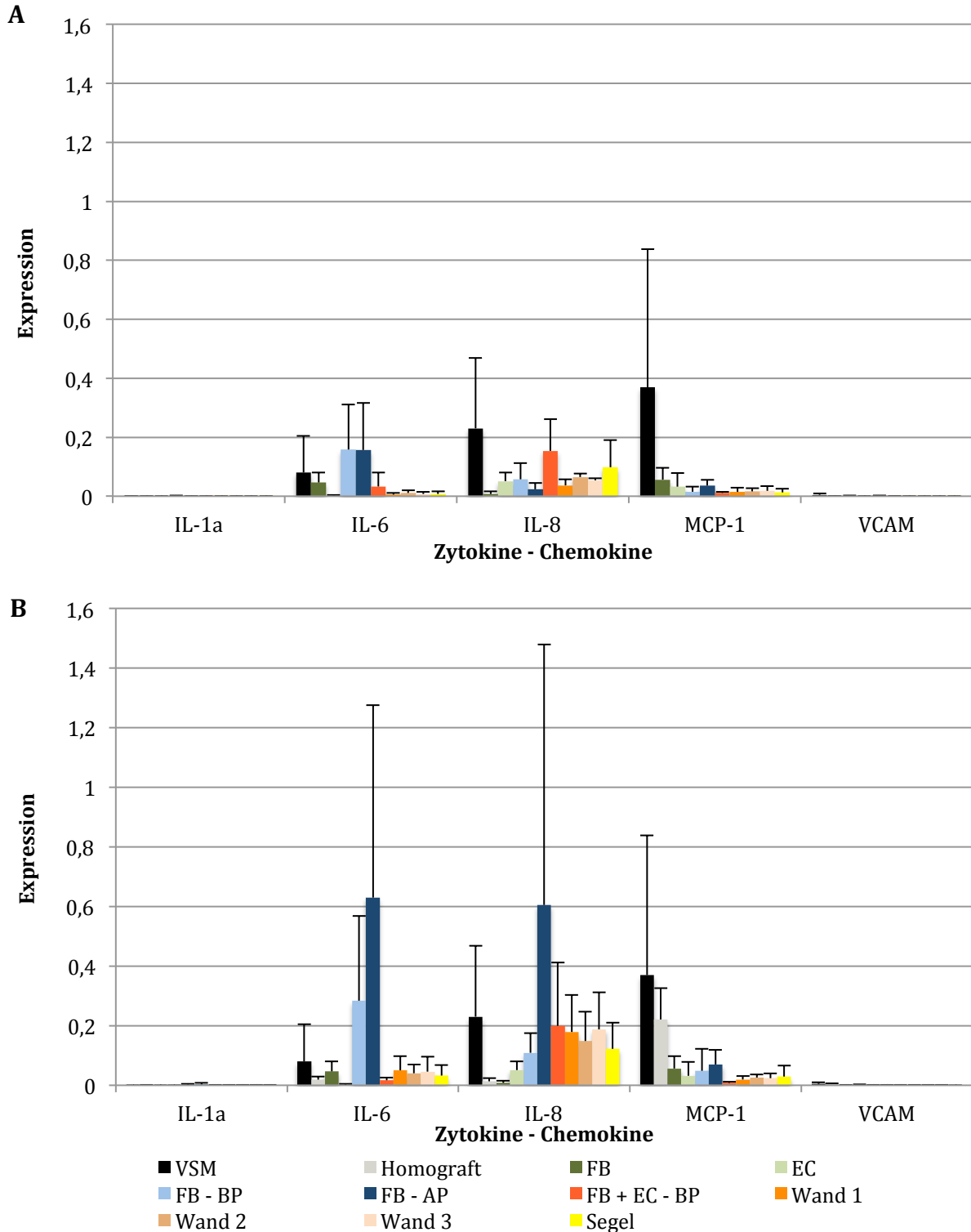
Diagramm 7-3: Darstellung der Genexpressionen von IL-6, IL-8 und MCP-1 vor und nach der zweiten Konditionierungsphase:



Legende: FB + EC BP = vor Konditionierung der Fibroblasten und Endothelzellen; FB + EC AP = nach Konditionierung der Fibroblasten und Endothelzellen; PU = Versuchsgruppe A; HO = Versuchsgruppe B.

7.3.4 Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse

Diagramm 7-4: Zusammenfassung der Genexpressionen von IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM im Verlauf der Versuche; Diagramm A stellt die Ergebnisse für Versuchsgruppe A dar, Diagramm B für Versuchsgruppe B:



Legende: VSM = Vena saphena magna; FB = Fibroblastenkultur; EC = Endothelzellkultur; FB - BP = fibroblastenbeschichtete Probe vor Konditionierung; FB - AP = fibroblastenbesch. Probe nach Konditionierung; FB + EC - BP = fibroblasten- und endothelzellbesch. Probe vor Konditionierung.

8 Diskussion

Durch den Anstieg der Lebenserwartung und die damit verbundene Zunahme der Über-60-Jährigen, ist es nötig, die Ansprüche an eine neu entwickelte Herzklappe von dieser Zielgruppe abzuleiten.[123] Dieser demografischen Entwicklung folgend, wird sich laut Hochrechnungen weltweit die Zahl der Patienten, welche einen Herzklappenersatz benötigen, von ca. 290000 im Jahr 2003 auf etwa 850000 im Jahr 2050 verdreifachen.[124] Bei der Versorgung dieser Patienten ist es dringend notwendig, die Nachteile, speziell die begrenzte Lebensdauer und die gerinnungsaktivierenden Oberflächen bisheriger Herzklappen zu verhindern.[9, 100] Dabei wird die Entwicklung von tissue-engineerten Herzklappen als vielversprechendster Weg angesehen.[16, 125] Bei der Auswahl der hierfür benötigten Zellen müssen nicht nur ihre Eignung und Gewinnbarkeit, sondern auch das Empfänger Klientel berücksichtigt werden. So entfallen beispielsweise embryonale Stammzellen neben ethisch-moralischen Bedenken und des Risikos der Entartung wegen der Unmöglichkeit des autologen Einsatzes in der oben genannten Zielgruppe.[77, 78, 126] Adulte Stammzellen, beispielsweise aus Nabelschnüren gewonnen, würden sich in der Zielgruppe auch nur heterolog, also in Verbindung mit einer Immunsuppressionstherapie einsetzen lassen können und disqualifizieren sich dadurch ebenfalls.[127, 128] Auch Zellen valvularen Ursprungs, welche von *Butcher JT et al.* zwar als äußerst potent zur Verwendung in einer tissue-engineerten Herzklappe beschrieben wurden, haben die gleiche limitierende Einschränkung.[129] Eine weitere Zell-Alternative stellen adulte, fertig ausdifferenzierte Zellen, beispielsweise aus der Vena saphena magna, dar. Für diese Zellquelle zeigten bereits mehrere Untersuchungen und Veröffentlichungen, auch in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, ihre Eignung für den Einsatz in einer tissue-engineerten Herzklappe.[130-132] Diese Ergebnisse bestätigend, konnten im Rahmen unserer Versuche zunächst zellspezifische Isolationen aus den Venen von über 60-jährigen Spendern, also der Zielgruppe entsprechend, durchgeführt werden. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Veröffentlichungen zeigten die gewonnenen Zellen durchweg exzellente Kultivierungseigenschaften und ermöglichten durch ihre hohe Zellteilungsrate einen schnellen Einsatz. Die gute Konditionierbarkeit, welche durch den

Rückgang der Expression pro-inflammatorischer Gene und den Aufbau einer extrazellulären Matrix bewiesen wurden, bestätigten außerdem ihre Eignung als Bestandteil einer tissue-engineerten Herzklappe. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse bestätigen also auch unsere Versuche, dass diese Zellquelle einen optimalen Kompromiss zwischen praktikabler Gewinnung und Herstellung einer anpassungsfähigen tissue-engineerten Herzklappe für den autologen Einsatz in der älteren Zielgruppe darstellt.

In der Entscheidungsfindung bezüglich eines Zellträgers wurden mehrere, auch bereits in der Medizin eingesetzte Materialien berücksichtigt. Abbaubare Werkstoffe wie beispielsweise Polyglykolsäure (PGA), Polyhydroxyalkanoat (PHA) oder Polylactid-co-Glycolid (PLGA) sind bereits vielfach in der Medizintechnik eingesetzt und auch schon zur Herstellung tissue-engineerter Herzklappen verwendet worden.[133-135] Allerdings sind von diesen Materialien zuversichtliche Ergebnisse bisher nur vom Einsatz in Pulmonalklappenposition beschrieben worden.[83, 98] Am ehesten zurückzuführen auf die hohen Druck- und Scherkräfte scheinen tissue-engineerte Herzklappen aus resorbierbaren Materialien den Anforderungen einer Aortenklappe anscheinend nicht ausreichend bzw. schnell genug gewachsen zu sein.[136, 137] Ein weiterer Nachteil dieser Materialien ist ihre zeitlich unkontrollierbare Degradation, sowie mögliche inflammatorische Reaktionen während der Resorptionsphase.[83, 138, 139] Unter diesen Gesichtspunkten erschien der Einsatz eines degradablen Werkstoffes zur Herstellung einer tissue-engineerten Aortenklappe nicht sinnvoll. Eine weitere Alternative bei der Wahl eines Scaffolds sind dezellularisierte biologische Herzklappen. Hierbei haben Homografts bereits vielversprechende mittelfristige in-vivo Resultate gezeigt.[140-142] Ein erheblicher Nachteil ist jedoch ihre limitierte Verfügbarkeit.[143] Diese Problematik könnte durch den Einsatz von dezellularisierte Xenografts umgangen werden, jedoch konnten sie in der klinischen Erprobung bisher nicht überzeugen.[144] Unter Berücksichtigung der oben genannten Argumente fiel die Wahl des Zellträgers auf Polyurethan, als synthetisches nicht-resorbierbares Material. Seit ca. 1965 vielseitig in den unterschiedlichsten medizinischen Produkten eingesetzt, hat es sich bezüglich Belastbarkeit und Haltbarkeit ausgezeichnet bewährt und wird bereits im Bereich TE eingesetzt.[145, 146] Seine gute Biokompatibilität wurde während unserer Versuche durch äquivalente inflammatorische Zellreaktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe untermauert. Als ein Nachteil sind zwar aus einigen klinischen Studien

Alterungsprozesse an Polyurethanimplantaten bekannt, jedoch sind diese signifikant geringer und langsamer als beispielsweise an degradablen Werkstoffen der Medizintechnik.[147, 148] So sind bisher weder an bereits zugelassenen medizinischen Implantaten aus identischem Polyurethan wie den eingesetzten Scaffolds Materialprobleme beschrieben worden, noch konnten während der Durchführung unserer Versuche degenerative Materialveränderungen festgestellt werden. Bereits erschienene Publikationen zeigten die ausgezeichnete Eignung kollagenfasern-imitierender gesprühter Polyurethanfäden zur Zellbesiedelung.[21, 149, 150] Neben der unkomplizierten Herstellung war es im Einklang mit oben genannten Publikationen während unserer Versuche möglich, eine effektive Zellbeschichtung durchzuführen. Dies wurde durch den IHC-Nachweis von FB, sowie einer konfluenten Zellschicht auf den REM-Aufnahmen bewiesen. Zusätzlich ermöglichte die Wandarchitektur der Scaffolds den Zellen eine stabile Verankerung, so dass auch unter Flussbelastungen keine Zellteppichablösung stattfand.

Die im Jahr 1962 erstmals verwendeten und seitdem vielfach eingesetzten und etablierten Homografts dienten als Vergleichsgruppe.[54] Ein direkter Vergleich der Zellen bzw. ihres Verhaltens auf Polyurethan gegenüber einer natürlichen biologischen Oberfläche war so während des gesamten Versuchsablaufs gewährleistet. Durch die Abwesenheit lebender Zellen in den Nativproben der Homografts konnten diese als „totes“ Gewebe klassifiziert werden und ermöglichen so einen direkten Vergleich der PCR-Ergebnisse, da diese von vitalem Gewebe, also den aufgetragenen Zellen, stammen müssen. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Ergebnissen ist die Abwesenheit von Zellen, in und auf den nativen Homograftproben, auf den Kryokonservierungsprozess zurück geführt worden. So zeigten *Lupinetti FM et al.*, dass diese Methode der Herzklappenkonservierung bei einer signifikanten Mehrheit der Homografts zu einem massiven Verlust von EC führt.[151]

Neben den PU-Klappen konnte auch auf die Homografts durch die FB-Beschichtung eine konfluente Zellschicht aufgebracht werden. Dies steht in Einklang mit den Resultaten von *Gulbins H et al.*, welche mit gleicher Methode ebenfalls eine effektive Zellbeschichtung erzielten.[107] Wie diese und andere Forschungsgruppen bereits publizieren konnten, eignete sich diese Vorbeschichtung aus FB dann auch in unseren Versuchen als optimaler Untergrund zu Besiedelung mit EC.[152-154] So zeigte sich nach der Beschichtung mit EC in beiden Gruppen eine gute Zelladhäsion zur darunter

liegenden FB-Schicht und ein insgesamt kräftiger Zellverband. Die so erzielte konfluente Zellschicht ist außerdem von entscheidender Bedeutung, wenn es in späteren in-vivo Einsätzen der tissue-engineerten PU-Klappe um die Vermeidung einer antikoagulatorischen Therapie geht.[7] Zusätzlich konnte die Endothelialisierung eine bemerkenswerte Minderexpression von IL-6 und MCP-1 hervorrufen. Zur Vermeidung von inflammatorischen Reaktionen bei einem in-vivo-Einsatz ist diese Herabregulation der pro-inflammatorischen Interleukinexpression in einer Umgebung frei von zielrezeptor-tragenden Zellen essentiell.[116, 117] *Simionescu A et al.* haben in diesem Zusammenhang in ihrem Artikel darauf hingewiesen, dass im Bereich TE die Vermeidung pro-inflammatorischen Stimuli entscheidend zum Erfolg der therapeutischen Maßnahme beiträgt.[155] Die, auf den ersten Blick negativ imponierende, persistierende IL-8-Expression muss hier allerdings unter gesonderten Gesichtspunkten betrachtet werden. Zum einen ist IL-8 zwar auch als chemotaktisch wirksames Interleukin bekannt, zum anderen sind ebenso neo-angiogenetische, pro-proliferative und anti-apoptotische Effekte beschrieben, welche als positive Eigenschaften klassifiziert werden können.[118, 119, 156]

Ein essentieller Bestandteil jedes Körpergewebes ist eine gewebstypische extrazelluläre Matrix, welche unter anderem Integrität und Stabilität des Gewebes gewährleistet.[157] Die durch die Verarbeitung der Zellen in unseren Versuchen verloren gegangene EZM muss zur Bereitstellung eines funktionstüchtigen Herzklappenimplantates erst durch adäquate Stimuli wieder aufgebaut werden. In diesem Zusammenhang konnten *Jockenhoevel et al.* und andere Forschungsgruppen bereits zeigen, dass flussabhängiger mechanischer Stress zur Bildung einer EZM bei kardiovaskulären TE Produkten essentiell ist.[94, 158-160] Diesen flussabhängigen EZM-Aufbau konnten wir in unseren Versuchen durch den Nachweis steigender Mengen von Collagen IV und Fibronectin in beiden Versuchsgruppen während der Konditionierungsphasen bestätigen. Außerdem konnte ein deutlich stärkerer Aufbau von EZM auf der flusszugewandten Seite nachgewiesen werden und steht damit im Einklang mit der Annahme von *MacKenna et al.*, dass die mechanische Reizung hier ein maßgeblicher Induktor ist.[161] Wobei jedoch erwähnt werden muss, dass eine wesentlich stärkere Bildung von EZM durch die zweite Konditionierungsphase hervorgerufen wurde. Ebenfalls ist durch diesen Versuchsabschnitt die EC-abhängige Synthese von VE-Cadherin induziert worden, was schon von *Fernandez P et al.* unter Scherstressbedingungen nachgewiesen werden

konnte.[162] VE-Cadherin ist als wichtiger Bestandteil der „Adherens Junction“ für die Integrität der Endothelbarriere zuständig und somit essentiell zur Ausbildung einer belastbaren EC-Schicht.[163] Der flussabhängige Scherstress auf die EC bewirkte außerdem eine strömungsrichtungsabhängige Zellausrichtung, insbesondere auf den Herzklappensegeln, wo die Fließbewegung am höchsten ist. Diese fluss- und strömungsabhängige Ausrichtung von EC in Gefäßen wurde bereits 1981 von *Langille BL et al.* demonstriert.[164] Eine, durch den flussabhängigen Scherstress ebenfalls bewirkte verstärkte Expression des Interleukins 1a, wie von *Dardik A et al.* beschrieben wurde, konnte während der Versuche jedoch nicht nachgewiesen werden.[165] Die ebenfalls weder in der PCR noch in der IHC signifikant nachweisbare Expression von VCAM bestätigt dies, da IL-1a ein Induktor dieses vaskulären Zelladhäsionsmoleküls ist.[120] Insgesamt waren ohnehin nur während der ersten Konditionierungsphase stärkere Anstiege pro-inflammatorischer Genexpressionen zu messen, während beispielsweise die IL-8-Expression durch die EC-Konditionierung in beiden Gruppen sogar rückläufig war. Unter Berücksichtigung dieser Argumente und der Tatsache, dass die zweite Konditionierungsphase eine deutlich stärkere EZM-Bildung zur Folge hatte, muss die Nützlichkeit der FB-Konditionierung in Frage gestellt werden. Eine weitere zeitliche Ausdehnung der EC-Konditionierung erscheint vor dem Hintergrund regredienter pro-inflammatorischer Genexpressionen und dem Aufbau der EZM in dieser Phase hingegen durchaus sinnvoll.

Insgesamt erscheint die Wahl des Trägermaterials und der Zellquelle für die Entwicklung einer tissue-engineerten Herzklappe für den Einsatz im erwachsenen Menschen ideal. Die Zellen ließen sich einfach gewinnen und effektiv auf ihr synthetisches Trägermaterial aufbringen. Die tendenziell sogar niedrigere pro-inflammatorische Genexpression in der Polyurethangruppe ist ein weiteres Indiz für die gute Biokompatibilität des synthetischen Werkstoffes. Außerdem erwiesen sich die Konditionierungsphasen als ein sehr wirkungsvolles Mittel, um die besiedelten Zellen langsam an Strömungs- und Druckverhältnisse zu gewöhnen. Natürlich können die Ergebnisse nicht direkt auf in-vivo Bedingungen übertragen werden, dennoch zeigen sie die überzeugende Eignung von Polyurethan zur Herstellung einer tissue-engineerten Herzklappe.

9 Zusammenfassung

Im Rahmen der Versuche ließen sich unterschiedliche Trägermaterialien biologischen und synthetischen Ursprungs in einem dynamischen Verfahren erfolgreich mit venösen Zellen beschichten. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Beschichtungseffizienz des Polyurethangewebes sogar etwas höher ist als die von Homografts. Im weiteren Verlauf der Versuche war es möglich, mit Hilfe eines Konditionierungsbioreaktors eine flussabhängige Adaptation der Zellen an Druck- und Scherkräfte hervorzurufen. Dies konnte insbesondere anhand des immunhistochemischen Nachweises von interzellulären Verbindungen und dem Aufbau einer kompetenten extrazellulären Matrix, besonders auf der flusszugewandten Seite, bewiesen werden. Durch ihre einfache Gewinnung und Kultivierung, die effektive Beschichtung und die guten Konditionierungsfähigkeiten haben sich die venösen Zellen dabei als Teil einer tissue-engineerten Herzklappe bewiesen. Anhand des äquivalenten Zellverhaltens, insbesondere bezüglich inflammatorischer Zellreaktionen, im Vergleich beider Versuchsgruppen während der Experimente bestätigte das Material Polyurethan seine Biokompatibilität. Zusätzlich sind seine hohe Lebensdauer und die physikalische Belastbarkeit weitere Gründe, den Einsatz als Scaffoldmaterial einer tissue-engineerten Herzklappe weiter zu verfolgen. Die Verbindung venöser Zellen mit einem Polyurethangerüst erscheint also für die Durchführung weiterer Versuche eine sinnvolle Kombination zu sein. Das Ziel, eine solche Herzklappenprothese möglicherweise in der Zukunft als Aortenklappenersatz für den Menschen anbieten zu können, sollte ebenfalls weiter verfolgt werden.

Ausblick und Weiterentwicklung

Die Ergebnisse der Referenzgruppe zeigen an mehreren Stellen die Möglichkeit auf, durch einen veränderten Versuchsablauf eine weiter verbesserte tissue-engineerte Herzklappe auf Basis eines Homografts herzustellen. Zum einen könnte der Zellverband durch eine verlängerte Ruhephase nach der Beschichtung gestärkter in die Konditionierungsphase gehen; zum anderen könnte eine Oberflächenmodifikation der Homografts durchgeführt werden. Eine verlängerte Konditionierungsperiode würde

außerdem eine weitere Vorbereitung auf die physiologischen Hochdruckbedingungen einer Aortenklappe bewirken.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen ist ein Anschlussversuch konzipiert und durchgeführt worden. Hierfür wurden die Homografts zunächst einem Dezellularisierungsschritt nach beschriebener Methode [102] unterzogen. In Kürze: Einem dynamischen 24-stündigen Dezellularisierungsschritt mittels der anionischen Tenside Deoxycholsäure (0,5 %) und Natriumdodecylsulfat (0,5 %), folgten sechs 24-stündige Waschgänge mit PBS (500 ml + 1 ml Penicillin-Streptomycin). Daraufhin wurde die FB-Besiedelung nach bekannter Methode durchgeführt (Kapitel 5.2.3. Zellbesiedelung), gefolgt von einer, nun auf sechs Tage verlängerten Ruhephase. Die anschließende Endothelialisierung und die zweite Ruhephase wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Abschließend fand eine 12-tägige Konditionierungsphase, mit einer Flusssteigerung am neunten Tag statt. An Puls und Minutenvolumen gab es keine Veränderungen im Bezug zu den Originalversuchen (Kapitel 5.2.4. Zellkonditionierung). Proben wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie in den Originalversuchen genommen und mittels REM und IHC Färbungen ausgewertet.

Eine faserige und raue Oberfläche in der rasterelektronischenmikroskopischen Auswertung der Proben konnte zunächst eine erfolgreiche Dezellularisierung nachweisen. Die effektiven Zellbeschichtungen konnten anhand von homogenen und konfluenten Zellschichten auf den REM-Aufnahmen, sowie den IHC-Färbungen dargestellt werden. Nach der 12-tägigen Konditionierungsphase zeigte sich auf allen Proben ein homogener und konfluenter Zellteppich. Die endothelzelltypische pflastersteinartige Oberfläche sowie eine deutliche strömungsabhängige Zellausrichtung konnte nachgewiesen werden. Die Bildung einer konditionierungsbedingten EZM wurde durch starke positive Färbungen gegen Collagen IV und Fibronectin bewiesen. (REM- und IHC-Bilder siehe Anhang: 7. Weiterführender Versuch)

Die Veränderung der Versuchsbedingungen nach oben genannten Kriterien erzielte eine eindeutige Verbesserung der Ergebnisse im Vergleich zu den Originalversuchen. Keinerlei erosive Veränderungen an der Zelloberfläche bestätigten die Wahl einer verlängerten Ruhephase sowie auch den erfolgreichen Einsatz der dezellularisierenden Vorbehandlung. Durch die Verlängerung der Zellkonditionierung konnte nicht nur eine starke EZM und gute Zelladhäsion nachgewiesen, sondern auch eine strömungsrichtungsabhängige Zellausrichtung beobachtet werden.

Zusammenfassend erscheinen die neu gewählten Versuchsbedingungen optimale Voraussetzungen bei der Herstellung *tissue-engineerter* Herzklappen auf Basis eines Homografts darzustellen.

10 Literaturverzeichnis

1. Health statistics and informatics Department, W., *Causes of death 2008, summary tables*, 2011, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
2. Malik, S., et al., *Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults*. *Circulation*, 2004. 110(10): p. 1245-50.
3. Ford, E.S., *The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study*. *Atherosclerosis*, 2004. 173(2): p. 309-14.
4. Pearson, T.A., et al., *AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases*. *American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee*. *Circulation*, 2002. 106(3): p. 388-91.
5. Haldar, S.M. and P.T. O'Gara, *Infective endocarditis: diagnosis and management*. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 2006. 3(6): p. 310-7.
6. Cohen, J.E., *Human population: the next half century*. *Science*, 2003. 302(5648): p. 1172-5.
7. de Campos, N.L., R.R. de Andrade, and M.A. Silva, *Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years*. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 2010. 25(4): p. 457-65.
8. Etienne, P.Y., et al., *Transaortic transcatheter aortic valve implantation with the edwards sapien valve: feasibility, technical considerations, and clinical advantages*. *The Annals of thoracic surgery*, 2011. 92(2): p. 746-8.
9. Hoffmann, G., G. Lutter, and J. Cremer, *Durability of bioprosthetic cardiac valves*. *Deutsches Arzteblatt international*, 2008. 105(8): p. 143-8.
10. Bloomfield, P., *Choice of heart valve prosthesis*. *Heart*, 2002. 87(6): p. 583-9.
11. Wu, Y., G.L. Grunkemeier, and A. Starr, *The value of aortic valve replacement in elderly patients: an economic analysis*. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2007. 133(3): p. 603-7.
12. Wu, Y., et al., *Cost-effectiveness of aortic valve replacement in the elderly: an introductory study*. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2007. 133(3): p. 608-13.

13. Akhyari, P., et al., [*Tissue engineering of heart valves*]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, 2011. 82(4): p. 311-8.
14. Zdrahala, R.J. and I.J. Zdrahala, *In vivo tissue engineering: Part I. Concept genesis and guidelines for its realization*. *Journal of biomaterials applications*, 1999. 14(2): p. 192-209.
15. Teebken, O.E., M. Wilhelmi, and A. Haverich, *Tissue engineering for heart valves and vascular grafts*. *Chirurg*, 2005. 76(5): p. 453-+.
16. Rabkin, E. and F.J. Schoen, *Cardiovascular tissue engineering*. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 2002. 11(6): p. 305-17.
17. Dohmen, P.M. and W. Konertz, *Tissue-engineered heart valve scaffolds*. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*, 2009. 15(6): p. 362-7.
18. Rieder, E., et al., *Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells*. *Circulation*, 2005. 111(21): p. 2792-7.
19. Vesely, I., *Heart valve tissue engineering*. *Circulation research*, 2005. 97(8): p. 743-55.
20. Gandaglia, A., et al., *Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations*. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 2011. 39(4): p. 523-31.
21. Akra, B., et al., *Biological Evaluation of Non-degradable Polyurethane for Aortic Valve Tissue Engineering*. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Vol 25, Pt 10*, 2009. 25(10): p. 5-6 315.
22. König, F., *Development of a Preconditioning Bioreactor for Heart Valve Tissue Engineering*, in *Chair of medical engineering, TU Munich 2010*, Technical University Munich: Munich. p. 87.
23. Steffel, J. and T.F. Lüscher, *Herz-Kreislauf*, 2011, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 1-7.
24. A., M.W., *Heart and Coronary Arteries*. 3 ed 1975, Berlin, Heidelberg, New York. 224.
25. Putz R., P.R., Sobotta, *Atlas der Anatomie des Menschen*, in *Atlas der Anatomie des Menschen 2006*, Putz R., Pabst R.: Munich. p. 74-89.
26. H., N.F., *Atlas der Anatomie des Menschen*, H.J. T., Editor 2003, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. p. 207-220.

27. Thews, G.V., P., *Herzfunktion*, in *Vegetative Physiologie* 2005, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 100-156.
28. Klinke, R.P., H.-C.; Silbernagl, S., *Das Herz; Das Kreislaufsystem*, in *Physiologie* 2005, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 137-222.
29. Schmid, C., *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie*, 2007, Steinkopff Verlag, Darmstadt. p. 41-71.
30. Fukuta, H. and W.C. Little, *The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling*. Heart failure clinics, 2008. 4(1): p. 1-11.
31. Toro, R., A. Mangas, and F. Gomez, [*Calcified aortic valve disease: association with atherosclerosis*]. Medicina clinica, 2011. 136(13): p. 588-93.
32. New, S.E. and E. Aikawa, *Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification*. Circulation research, 2011. 108(11): p. 1381-91.
33. Gil-Dones, F., et al., *Valvular aortic stenosis: a proteomic insight*. Clinical Medicine Insights. Cardiology, 2010. 4: p. 1-7.
34. Carabello, B.A., *Clinical practice. Aortic stenosis*. The New England journal of medicine, 2002. 346(9): p. 677-82.
35. Miller, J.D., R.M. Weiss, and D.D. Heistad, *Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms*. Circulation research, 2011. 108(11): p. 1392-412.
36. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation, 2005. 111(24): p. 3316-26.
37. Thomas Christen, R.L., Pedro Trigo Trindade, *Die Aortenklappenstenose beim Erwachsenen Teil 1. Ätiologie, Pathophysiologie und Diagnose*. Schweiz Med Forum, 2006(6): p. 626-632.
38. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie*, 2009, Springer Berlin Heidelberg. p. 397-421.
39. Lanna, C.C., et al., *Subclinical rheumatic valvitis: a long-term follow-up*. Cardiology in the young, 2003. 13(5): p. 431-8.
40. C.K. Naber, B.A.-N., H. Baumgartner, H.-J. Becker, M. Block, R. Erbel,, et al., *Prophylaxe der infektiösen Endokarditis*. Kardiologie, 2007. 1: p. 243-250.
41. Salinas, P., R. Moreno, and J.L. Lopez-Sendon, *Transcatheter aortic valve implantation: Current status and future perspectives*. World journal of cardiology, 2011. 3(6): p. 177-85.
42. Nkomo, V.T., *Indications for surgery for aortic regurgitation*. Current cardiology reports, 2003. 5(2): p. 105-9.

43. Stout, K.K. and C.M. Otto, *Indications for aortic valve replacement in aortic stenosis*. Journal of intensive care medicine, 2007. 22(1): p. 14-25.
44. P. Libera, W.G.t., C. Schreiber, R. Bauernschmitt, R. Lange, *Innovative Aortenklappenimplantation*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 1403-1418.
45. Greif, M., et al., *Transcatheter Edwards Sapien XT valve in valve implantation in degenerated aortic bioprostheses via transfemoral access*. Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society, 2012. 101(12): p. 993-1001.
46. Lansac, E., et al., *An aortic ring: from physiologic reconstruction of the root to a standardized approach for aortic valve repair*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2010. 140(6 Suppl): p. S28-35; discussion S45-51.
47. Albes, J.M., *Aortic valve reconstruction: why, when, and how?* The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2010. 58(2): p. 61-8.
48. W., S.L., *History of Cardiac Surgery*, in *Cardiac Surgery in the Adult*, E.L.J. Cohn LH, eds., Editor 2003, McGraw-Hil: New York. p. 3-29.
49. Hufnagel, C.A., P.D. Villegas, and H. Nahas, *Experiences with new types of aortic valvular prostheses*. Annals of surgery, 1958. 147(5): p. 636-44; discussion 644-5.
50. Starr, A. and M.L. Edwards, *Mitral replacement: clinical experience with a ball-valve prosthesis*. Annals of surgery, 1961. 154: p. 726-40.
51. Gott, V.L., D.E. Alejo, and D.E. Cameron, *Mechanical heart valves: 50 years of evolution*. The Annals of thoracic surgery, 2003. 76(6): p. S2230-9.
52. Harken, D.E., et al., *Partial and complete prostheses in aortic insufficiency*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1960. 40: p. 744-62.
53. Tillquist, M.N. and T.M. Maddox, *Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement*. Patient preference and adherence, 2011. 5: p. 91-9.
54. Heimbecker, R.O., et al., *Homograft replacement of the human mitral valve. A preliminary report*. Canadian Medical Association journal, 1962. 86: p. 805-9.
55. Ross, D.N., *Homograft replacement of the aortic valve*. Lancet, 1962. 2(7254): p. 487.
56. Barratt-Boyes, B.G., *Homograft Aortic Valve Replacement in Aortic Incompetence and Stenosis*. Thorax, 1964. 19: p. 131-50.

57. Ross, D.N., *Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft*. Lancet, 1967. 2(7523): p. 956-8.
58. Binet, J.P., *Pioneering in heterografts*. The Annals of thoracic surgery, 1989. 48(3 Suppl): p. S71-2.
59. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. The Annals of thoracic surgery, 2005. 79(3): p. 1072-80.
60. Birkmeyer, N.J., et al., *Prosthetic valve type for patients undergoing aortic valve replacement: a decision analysis*. The Annals of thoracic surgery, 2000. 70(6): p. 1946-52.
61. Rahimtoola, S.H., *Choice of prosthetic heart valve for adult patients*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. 41(6): p. 893-904.
62. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.
63. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. Journal of cellular and molecular medicine, 2006. 10(3): p. 569-76.
64. Vacanti, C.A. and J.P. Vacanti, *The science of tissue engineering*. The Orthopedic clinics of North America, 2000. 31(3): p. 351-6.
65. J. Mayer, J.B., E. Wintermantel, *Grundlagen des Tissue Engineering*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 373-386.
66. E. Wintermantel, B.S.-D., A. Bruinink, M. Petitmermet, J. Blum, S.-W. Ha, *Biokompatibilität*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 67-104.
67. Gunatillake, P.A. and R. Adhikari, *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European cells & materials, 2003. 5: p. 1-16; discussion 16.
68. Stock, U.A. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: current state and prospects*. Annual review of medicine, 2001. 52: p. 443-51.
69. K. Ruffieux, E.W., *Degradable Implantate: Entwicklungsbeispiele*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 1585-1599.
70. K.-L. Eckert, J.B., E. Wintermantel, *Zellträgersysteme*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 431-442.
71. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.

72. Nieminen, O., K. Nordstrom, and P. Kurki, *Tissue engineering: viable technologies seeking regulation -- a Finnish perspective*. Drug discovery today, 2004. 9(9): p. 387-91.
73. Hodges, S.J.A., A., *Tissue-Engineered Organs*, in *Principles of Tissue Engineering*, L. Lanza, and Vacanti, Editor 2007, Elsevier, Inc. p. 1253-1261.
74. Helmy, K.Y., et al., *Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise*. Therapeutic delivery, 2010. 1(5): p. 693-705.
75. Isagawa, T., et al., *DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers*. PloS one, 2011. 6(10): p. e26052.
76. Thomson, M., et al., *Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers*. Cell, 2011. 145(6): p. 875-89.
77. Breuer, S., et al., *Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, 2011.
78. *Adulte Stammzellforschung ausweiten, Forschung in der regenerativen Medizin voranbringen und Deutschlands Spitzenposition ausbauen*, 2010, Deutscher Bundestag: Germany.
79. Brunet, A. and T.A. Rando, *Ageing: from stem to stern*. Nature, 2007. 449(7160): p. 288-91.
80. Centeno, C.J., et al., *Safety and Complications Reporting Update on the Re-implantation of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells using Autologous Platelet Lysate Technique*. Current stem cell research & therapy, 2011.
81. Yamaoka, E., et al., *Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells*. International journal of oncology, 2011. 39(1): p. 5-11.
82. Hilfiker, A., et al., *Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation?* Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie, 2011. 396(4): p. 489-97.
83. Mendelson, K. and F.J. Schoen, *Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges*. Annals of biomedical engineering, 2006. 34(12): p. 1799-819.
84. Wendt, D., et al., *Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives*. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 2009. 112: p. 1-27.
85. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends in biotechnology, 2004. 22(2): p. 80-6.

86. Chmiel, H., *Bioreaktoren*, in *Bioprozesstechnik* 2011, Spectrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 197-236.
87. Drews, G., *Mikroorganismen im Dienste des Menschen: Biotechnologie*, in *Mikrobiologie* 2010, Springer: Heidelberg Dordrecht London New York. p. 209-213.
88. Antranikian, G., *Angewandte Mikrobiologie*. 1. ed 2006, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 536.
89. W. Minuth, K.S., R. Strehl, U. de Vries, *Mikroreaktortechnik für Tissue Engineering*, in *Medizintechnik*, S.-W.H. Erich Wintermantel, Editor 2009, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 387-402.
90. Chen, H.C. and Y.C. Hu, *Bioreactors for tissue engineering*. *Biotechnology letters*, 2006. 28(18): p. 1415-23.
91. Woon, C.Y., et al., *Three-Dimensional-Construct Bioreactor Conditioning in Human Tendon Tissue Engineering*. *Tissue engineering. Part A*, 2011.
92. Brown, M.A., R.K. Iyer, and M. Radisic, *Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. *Biotechnology progress*, 2008. 24(4): p. 907-20.
93. Berry, J.L., et al., *Bioreactors for development of tissue engineered heart valves*. *Annals of biomedical engineering*, 2010. 38(11): p. 3272-9.
94. Bilodeau, K. and D. Mantovani, *Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review*. *Tissue engineering*, 2006. 12(8): p. 2367-83.
95. Weber, B., et al., *Tissue engineering on matrix: future of autologous tissue replacement*. *Seminars in immunopathology*, 2011. 33(3): p. 307-15.
96. Shinoka, T., *Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold*. *Artificial organs*, 2002. 26(5): p. 402-6.
97. Zund, G., et al., *Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh*. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 1998. 13(2): p. 160-4.
98. Sodian, R., et al., *Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves*. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III22-9.

99. Schaefermeier, P.K., et al., *Design and fabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering of human heart valves*. European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes, 2009. 42(1): p. 49-53.
100. Neuenschwander, S. and S.P. Hoerstrup, *Heart valve tissue engineering*. Transplant immunology, 2004. 12(3-4): p. 359-65.
101. Lichtenberg, A., et al., *In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions*. Biomaterials, 2006. 27(23): p. 4221-9.
102. Cebotari, S., et al., *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. Artificial organs, 2010. 34(3): p. 206-10.
103. Cebotari, S., et al., *Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix*. Circulation, 2002. 106(12 Suppl 1): p. I63-I68.
104. Fang, N.T., et al., *Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells*. Chinese medical journal, 2007. 120(8): p. 696-702.
105. Sodian, R., et al., *Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering*. Tissue engineering, 2002. 8(5): p. 863-70.
106. Stamm, C.S., G., *Kardiales Tissue Engineering*. Herz, 2002. 27(5): p. 445-52.
107. Gulbins, H., et al., *Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini-roots: development of a seeding device and procedure*. The Annals of thoracic surgery, 2005. 79(6): p. 2119-26.
108. Brunner, G., *Applications of supercritical fluids*. Annual review of chemical and biomolecular engineering, 2010. 1: p. 321-42.
109. Ardenne, M., *Das Elektronen-Rastermikroskop*. Zeitschrift für Physik, 1938. 109(9-10): p. 553-572.
110. Ramos-Vara, J.A., *Technical aspects of immunohistochemistry*. Veterinary pathology, 2005. 42(4): p. 405-26.
111. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic acids research, 2004. 32(12): p. e103.
112. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. 239(4839): p. 487-91.

113. Mullis, K.B., *The polymerase chain reaction* 1994, Boston: Birkhäuser.
114. Butte, A.J., V.J. Dzau, and S.B. Glueck, *Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues"*. *Physiological genomics*, 2001. 7(2): p. 95-6.
115. Hsiao, L.L., et al., *A compendium of gene expression in normal human tissues*. *Physiological genomics*, 2001. 7(2): p. 97-104.
116. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview*. *Annual review of immunology*, 1990. 8: p. 253-78.
117. Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima, *Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions*. *Cytokine & growth factor reviews*, 1998. 9(1): p. 9-23.
118. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. *Journal of immunology*, 2003. 170(6): p. 3369-76.
119. Heidemann, J., et al., *Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2*. *The Journal of biological chemistry*, 2003. 278(10): p. 8508-15.
120. Bevilacqua, M.P., *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. *Annual review of immunology*, 1993. 11: p. 767-804.
121. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. *Analytical biochemistry*, 1997. 245(2): p. 154-60.
122. Viovy, J.-L., *Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms*. *Reviews of Modern Physics*, 2000. 72(3): p. 813-872.
123. Yacoub, M.H. and L.H. Cohn, *Novel approaches to cardiac valve repair: from structure to function: Part I*. *Circulation*, 2004. 109(8): p. 942-50.
124. Yacoub, M.H. and J.J. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 2005. 2(2): p. 60-1.
125. Lalan, S., I. Pomerantseva, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering and its potential impact on surgery*. *World journal of surgery*, 2001. 25(11): p. 1458-66.
126. Reimann, V., U. Creutzig, and G. Kogler, *Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine*. *Deutsches Arzteblatt international*, 2009. 106(50): p. 831-6.

127. Breymann, C., D. Schmidt, and S.P. Hoerstrup, *Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering*. Stem cell reviews, 2006. 2(2): p. 87-92.
128. Montanucci, P., et al., *New Simple and Rapid Method for Purification of Mesenchymal Stem Cells from the Human Umbilical Cord Wharton Jelly*. Tissue engineering. Part A, 2011.
129. Butcher, J.T., et al., *Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. 24(8): p. 1429-34.
130. Schaefermeier, P.K., et al., *Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells*. ASAIO journal, 2009. 55(1): p. 86-92.
131. Schnell, A.M., et al., *Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2001. 49(4): p. 221-5.
132. Schmidt, D. and S.P. Hoerstrup, *Tissue engineered heart valves based on human cells*. Swiss medical weekly, 2007. 137 Suppl 155: p. 80S-85S.
133. Sodian, R., et al., *Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences*. The Annals of thoracic surgery, 2000. 70(1): p. 140-4.
134. Stock, U.A. and J.E. Mayer, Jr., *Tissue engineering of cardiac valves on the basis of PGA/PLA Copolymers*. Journal of long-term effects of medical implants, 2001. 11(3-4): p. 249-60.
135. Webb, A.R., J. Yang, and G.A. Ameer, *Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering*. Expert opinion on biological therapy, 2004. 4(6): p. 801-12.
136. Balachandran, K., P. Sucusky, and A.P. Yoganathan, *Hemodynamics and mechanobiology of aortic valve inflammation and calcification*. International journal of inflammation, 2011. 2011: p. 263870.
137. Weston, M.W., D.V. LaBorde, and A.P. Yoganathan, *Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet*. Annals of biomedical engineering, 1999. 27(4): p. 572-9.
138. Yang, S.F., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors*. Tissue Engineering, 2001. 7(6): p. 679-689.
139. Filova, E., et al., *Tissue-engineered heart valves*. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca, 2009. 58 Suppl 2: p. S141-58.
140. da Costa, F.D., et al., *The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts*. The Annals of thoracic surgery, 2010. 90(6): p. 1854-60.

141. Akhyari, P., et al., *In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2010. 38(5): p. 539-46.
142. Baraki, H., et al., *Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model*. Biomaterials, 2009. 30(31): p. 6240-6.
143. E.M. Delmo Walter, T.M.M.H.d.B., R. Meyer, R. Hetzer, *The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin*. HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia, 2012. 4(2): p. 97-108.
144. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2003. 23(6): p. 1002-6; discussion 1006.
145. Grasl, C., et al., *Electrospun polyurethane vascular grafts: in vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2010. 93(2): p. 716-23.
146. Zdrahala, R.J. and I.J. Zdrahala, *Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future*. Journal of biomaterials applications, 1999. 14(1): p. 67-90.
147. Szycher, M., *Biostability of polyurethane elastomers: a critical review*. Journal of biomaterials applications, 1988. 3(2): p. 297-402.
148. Kim, M.S., et al., *Polymeric Scaffolds for Regenerative Medicine*. Polymer Reviews, 2011. 51(1): p. 23-52.
149. Gulbins, H., et al., *Development of an artificial vessel lined with human vascular cells*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2004. 128(3): p. 372-7.
150. Gulbins, H., et al., *Seeding of human vascular cells onto small diameter polyurethane vascular grafts*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2006. 54(2): p. 102-7.
151. Lupinetti, F.M., et al., *Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1993. 106(5): p. 912-7.
152. Gulbins, H., et al., *Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2003. 125(3): p. 592-601.
153. Akra, B., et al., *Perfusion Bioreactor: A New Pulsatile System for the Perfusion of Tissue Engineered Cardiovascular Prostheses*. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Vol 25, Pt 10, 2009. 25(10): p. 7-8 315.

154. Hoerstrup, S.P., et al., *Tissue engineering of small caliber vascular grafts*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2001. 20(1): p. 164-9.
155. Simionescu, A., et al., *Inflammation in cardiovascular tissue engineering: the challenge to a promise: a minireview*. International journal of inflammation, 2011. 2011: p. 958247.
156. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS letters, 1992. 307(1): p. 97-101.
157. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. The Journal of pathology, 2003. 200(4): p. 423-8.
158. Jockenhoevel, S., et al., *Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for in vitro improvement of mechanical tissue properties*. ASAIO journal, 2002. 48(1): p. 8-11.
159. Mol, A., et al., *Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach*. Annals of biomedical engineering, 2005. 33(12): p. 1778-88.
160. Gulbins, H., et al., *A low-flow adaptation phase improves shear-stress resistance of artificially seeded endothelial cells*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2005. 53(2): p. 96-102.
161. MacKenna, D., S.R. Summerour, and F.J. Villarreal, *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis*. Cardiovascular research, 2000. 46(2): p. 257-63.
162. Fernandez, P., et al., *Gene response in endothelial cells cultured on engineered surfaces is regulated by shear stress*. Tissue engineering, 2007. 13(7): p. 1607-14.
163. Corada, M., et al., *Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability*. Blood, 2001. 97(6): p. 1679-84.
164. Langille, B.L. and S.L. Adamson, *Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice*. Circulation research, 1981. 48(4): p. 481-8.
165. Dardik, A., et al., *Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha*. Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, 2005. 41(2): p. 321-31.

11 Anhang

1. Materialien

Medien und Reagenzien

Artikel	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
ACE Substrate Kit	SK4200	Vector Alexis Deutschland
2-Mercaptoethanol, 99%	63689	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Acetone for analysis	1.00014.5000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Antibody Diluent	S3022	DakoCytomation, Hamburg, D
Bacillol AF	973380	Bode Chemie, Hamburg, D
Buffer TE, Endotoxin-free	1018499	Qiagen GmbH, Hilden, D
Collagenase Type 2	4176 (M6P752)	Worthington Corp., Lakewood, US
Cryomatrix	6769006	Richard-Allan Scientific, MI, USA
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	D5758	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Dimethyl Sulfoxid	D2438	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
DNA-Exitus Plus	A7089.0500	Appllichem GmbH, Darmstadt, D
Endothelial Cell Growth Medium	C-22010	Promocell GmbH, Heidelberg, D
Endothelial Cell Growth Medium Supplement Pack	C-39210	Promocell GmbH, Heidelberg, D
Envision + Dual Link System - HRP	K4061	DakoCytomation, Hamburg, D
Ethanol <99,8 %, DAB, reinst	K928.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol 30 %, vergällt	E05	Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 50 %, vergällt	L0147	Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 70 %, vergällt	L148	Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 96 %, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol absolut, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
FBS Lot No: 9SB025	DE14-801C	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Fermacidal D2, Desinfektionsmittel für Flächen und Gegenstände	N24040	DROL-Laborgeräte, Reichertshausen, D
Fibroblast Growth Medium	C-23010	Promocell GmbH, Heidelberg, D
Fibroblast Growth Medium Supplement Pack	C-23110	Promocell GmbH, Heidelberg, D
Flash Gel DNA Marker 50 bp – 1,5 K bp	57033	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Flash Gel Loading Dye	50462	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Gentamycin 10 mg/ml	A2712	Biochrom GmbH, Berlin, D
Glutaraldehyd Lösung Lot: 430638/1	49630	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Glutaraldehyd Lsg., 25 Gew. %	G400-4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Glycerin	7530	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Heparin 5000 i.E.	5394.00.00	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Humanes Serumalbumin 200 g/l	03272.01.1	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Hydrochloric Acid 1N Solution	194055	ICN GmbH, Northeim, D
Mayers Hämlaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, D
Medium (M) 199	F-0665	Biochrom GmbH, Berlin, D
PBS	L-1825	Biochrom GmbH, Berlin, D
PBS Dulbecco Instamed 9,55 g/l	L182-50	Biochrom GmbH, Berlin, D
Penicillin Streptomycin Solution Stabilized	P4458	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Pronase	P8038	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Quanti Fast SYBR Green PCR Kit	204054	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Reverse Transcription Kit	205311	Qiagen GmbH, Hilden, D
Rnase-Exitus Plus	A-7153,1000RF	Applichem GmbH, Darmstadt, D
Rneasy Plus Mini Kit	74134	Qiagen GmbH, Hilden, D
Roti-Histofix 4 %	P087.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Schweineserum	X0901	DakoCytomation, Hamburg, D
Sodium cacodylate trihydrate (Na-CaCO)	C0250	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Sterillium	975512	Bode Chemie, Hamburg, D
Target Retrieval Solution 10x Concentrate	S1699	DakoCytomation, Hamburg, D
Tris-Bolersate-EDTA, Buffer, 10x Concentrate	T4415-4L	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Triton X	3051	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypanblau Sol. 0,4 %	T8154	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Trypsin-EDTA 10x Solution	T-4174	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Ultramount, Aqueous Permanent Mounting Medium	S1964	DakoCytomation, Hamburg, D
Wasserstoffperoxid 30 %	21676-3	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylol	9713.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Antikörper der Immunhistochemie

Antikörper	Konzentration (Verdünnung)	Artikelnummer	Hersteller
Anti-Fibroblast, clone TE-7	0,1 mg/ml	CBL 271	Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., D
Anti-Fibronectin	0,6 mg/ml	F-3648	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Anti-ICAM-1, clone W-CAM-1	1:20	MAB 2130	Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., D
CD 31 Antikörper	1:30	DLN-10338	Dianova GmbH, Hamburg, D
Collagen Typ IV	5,4 mg/ml	C-1926	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Connexin-43	1 mg/ml	MAB 3067	Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., D
LAB CD106 / VCAM-1 AB-3 Maus	200 µg/ml	MS-1101-P	ThermoFisher Scientific, Waltham , USA
SMC-myosin Antikörper	954 mg/l	M-3558	DakoCytomation, Hamburg, D
VE-Cadherin Clone TEA 1/31	0,2 mg/ml	PN IM 1597	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
α-actin Antikörper	44 mg/l		DakoCytomation, Hamburg, D

Primer der rt-PCR

Primer	Artikelnummer	Hersteller
Quanti Tect Primer Assay CCL2	QT 00212730	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Primer Assay GAPDH	QT 01192646	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Primer Assay IL-1α	QT 00001127	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Primer Assay IL-6	QT 00083720	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Primer Assay IL-8	QT 00000322	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quanti Tect Primer Assay VCAM	QT 00018347	Qiagen GmbH, Hilden, D

Medienzusammensetzung

Medium	Reagenz	Menge
EDTA-Lösung pH 8 -Lagerung: RT	EDTA	0,744g
	0,1N NaOH	Bis pH = 8
	Aqua dest.	2 l
Fix II (500 ml) -Lagerung: 4 °C	Aqua bidest	456 ml
	Glutaraldehyd (25 %)	43,5 ml
	HCL (1 N)	0,75 ml
	Na-CaCO	5,65 g
Kulturmedium Endothelzellen (6 % FBS) -Lagerung: 4 °C	Endothelial Cell Growth Medium	500 ml
	Endothelial Cell Growth Medium Suppl. Pack	
	FBS	30 ml
	Penicillin-Streptomycin	1 ml
Kulturmedium Fibroblasten (11 % FBS) -Lagerung: 4 °C	Fibroblast Growth Medium	500 ml
	Fibroblast Growth Medium Suppl. Pack	
	FBS	55 ml
	Penicillin-Streptomycin	1 ml
Mayer's Hämalanlösung (1:4) -Lagerung: RT	Hämanlaun	50 ml
	PBS	150 ml
PBS-BRIJ-35 -Lagerung: RT	PBS	1 l
	BRIJ-35	1,25 ml
Spülmedium (500 ml) -aliqu.: 15 ml -Lagerung: -20 °C	M 199	494 ml
	Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
	Heparin (5000 i.E.)	1 ml
Stoppmedium (500 ml) -aliquotiert (aliqu.): 15 ml -Lagerung: -20 °C	M 199	444 ml
	Heparin (5000 i.E.)	1 ml
	Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
	FBS	50 ml
Tris 10 mM für RNA-Messung	Aqua bidest	250 ml
	DEPC	0,25 ml
	Tris-Chlorid	394 mg
Trypsin 1:20 (500 ml) -aliqu.: 50 ml -Lagerung: -20 °C	PBS	475 ml
	Trypsin (10x)	25 ml

Verbrauchsmaterialien

Artikel	Artikelnummer	Hersteller / Lieferant
Aquarellpinsel Serie 1520L	372610002	Reiss Laborbedarf e.K., Mainz-Mombach, D
Biosphere Filter Tips 10 µl, steril	70.1116.210	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
Biosphere Filter Tips 100 µl, steril	70760212	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
Biosphere Filter Tips 1250 µl, steril	70.1186.210	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
Borstenpinsel Serie 7179L	372640012	Reiss Laborbedarf e.K., Mainz-Mombach, D
Bottle Top Filter 0,2 µm	595-4520	Nalgene, Rochester, USA
Bottle Top Filter 0,45 µm	295-4545	Nalgene, Rochester, USA
Cell culture flask 12,5 cm ²	353107	BD Biosciences
Costar, cell culture flask 162 cm ²	3151	Corning B.V. Life Science, Amsterdam, NL
Costar, cell culture flask 75 cm ²	3290	Corning B.V. Life Science
Cover Slides 4 Kammern	354104	BD, Heidelberg, D
Cover Slides 8 Kammern	354108	BD, Heidelberg, D
Cryotube 1,8 ml Lot: 107909	375418	Nunc A/S, Kamstrup, Dänemark
Deckgläser 50x24 mm	631-0146	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Deckgläser 20 mm, rund	P234.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dreiwegehahn	16494 C	B. Braun Medical AG, Escholzmatt, Schweiz
Flasche 500 ml, steril	8393	Corning Inc., Corning, USA
Handschuhe OP Größe 7,5, steril	74665	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, D
Handschuhe Peha-soft Größe M, unsteril	942727	Hartmann AG, Heidenheim, D
Kanüle 0,90 x 70,0 mm	NN-2070S	Terumo N.V., Leuven, Belgien
Low Profile Blades SEC 35	152200	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA
Luer-Lock männlich	28834	Novodirect GmbH, Kehl/Rhein, D
Multi Reaktionsgefäße 0,65 ml	7060.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Objektträger 25x75x1,0 mm, Superfrost	J1800AMNZ	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Perfusorspritze o. Kan. 50 ml, steril	300137	BD, Heidelberg, D
Pipetboy Sterilfilter	153015	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, D
Pipette serol. 1 ml, steril	4485	Corning Inc., Corning, USA
Pipette serol. 10 ml, steril	4488	Corning Inc., Corning, USA
Pipette serol. 2 ml, steril	4486	Corning Inc., Corning, USA
Pipette serol. 25 ml, steril	4489	Corning Inc., Corning, USA

Pipette serol. 5 ml, steril	4487	Corning Inc., Corning, USA
Pipette serol. 50 ml, steril	768180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
PP-Dose mit Deckel, 38/54 mm	216-3180	VWR International GmbH, Darmstadt, D
PP-Dose mit Deckel, 54/62 mm	216-3182	VWR International GmbH, Darmstadt, D
PP-Röhrchen 15 ml, steril	62554502	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
PP-Röhrchen 50 ml, steril	210261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
PP-Röhre 50 ml, steril	62547254	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
SecuDrape 45 x 75 cm Abdecktuch	504572	Sengewald GmbH, Rohrdorf- Thansau, D
Silikonspray 500 ml	198102	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf, D
Skalpell Fig. 11, steril	02.001.30.011	Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Skalpell Fig. 20, steril	02.001.30.020	Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Spritze 20 ml	300296	BD Biosciences, Heidelberg, D
Strip tubes and Caps 0,1 ml	981103	Qiagen GmbH, Hilden, D
Suprolene 3/0, 75 cm, grün	91513	Resorba, Nürnberg, D
Syringe Driven Filter Unit 0,22 µm	SLGS 03355	Miller-GS
Tissue culture coverslip 25 mm	83.1840	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
Transferpipette 3,5 ml, steril, einzeln verp.	861171001	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, D
Wärmeleitpaste, silikonfrei	650180	Fischerelektronik GmbH, Lüdenscheid, D
Zählkammern, C-Chip	PDHC-N01	Biochrom GmbH, Berlin, D
Zentrifugenröhrchen 30 ml, steril	201170	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen 50 ml, steril	210261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Geräteliste

Gerät	Model / Typ	Hersteller
Biophotometer		Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank	Binder CB 150	Binder, Tuttlingen, D
Brutschrank	HeraCell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Kühleinheit	Microm KS 34	ThermoFisher Scientific, Waltham , USA
Laminaflow	HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Lichtmikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Camera AG, Solms, D
Mastercycler gradient		Eppendorf, Hamburg, D
Mikrotom	MH 400 R	Microm International GmbH, Walldorf, D
PCR-Workstation		Peqlab GmbH, Erlangen, D
Rotor-Gene Q		Qiagen GmbH, Hilden, D
Wärmebad	Julaba SW 23	Julaba
Wärmeschrank	WTC	Binder, Tuttlingen, D
Wasserbad	Medax	Nagel GmbH
Zentrifuge	Mikro 22 R	A. Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Zentrifuge	Rotina 46 R	A. Hettich GmbH, Tuttlingen, D

2. Einverständniserklärung für Patienten zur Einwilligung der Verwendung ihrer Venenstücke

Klinikum der Universität München • Herzchirurgische Klinik und Poliklinik Labor für Tissue Engineering • Marchioninstr. 15 • 81377 München		M.Sc. Bassil Akra Biomedical Engineer Tel. +49 (0) 89 7095 - 6465 Fax. +49 (0) 89 7095 - 8873 Bassil.akra@med.uni-muenchen.de Marchioninstr. 15, D-81377 München
Ihr Zeichen:	Unser Zeichen:	München,

Patienteneinverständniserklärung zur klinischen Forschung

Sehr geehrte/r Frau/Herr
 nach Ihrer Bypassoperation in unserem Hause hoffe ich, dass Sie weiterhin auf dem Weg der
 Besserung sind.

Mein Anliegen an Sie ist folgendes:

Ich bin Ingenieur der Biomedizintechnik und forsche auf dem Gebiet der Herzchirurgie an
 verschiedenen Möglichkeiten zur Verbesserung der zur Zeit verfügbaren Implantate und der
 Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. Dazu ist es notwendig humane Zellen zu
 isolieren, zu vermehren und in vitro Untersuchungen und Tests durchzuführen.

Bei Ihrer Bypassoperation wurden Venen entnommen, nach Bedarf auf die richtige Länge
 zurechtgeschnitten und implantiert. Bei diesem Verfahren ist es so, dass die nicht
 verwendeten Venenstücke entsorgt werden. Diese Venenreste stellen allerdings eine geeignete
 Quelle für die o. g. Zellisolierung dar. Deshalb bitte ich Sie, die beiliegende
 Einverständniserklärung gut durchzulesen und zu unterschreiben um so auch einen Anteil an
 der zukunftsweisenden Medizin beitragen zu können.

Ich bedanke mich schon jetzt für Ihr Verständnis. Einen frankierten Rückumschlag habe ich
 beigelegt. Sollten Sie Fragen dazu haben, können Sie mich jederzeit unter o. g.
 Telefonnummer erreichen.

Mit freundlichen Grüßen

M. Sc. Bassil Akra

Anlage

1 frankierter Rückumschlag

3. Immunhistochemische Analyse der Zellkulturen

Nachweis der Reinheit und Spezifität der isolierten und gezüchteten Endothel- und Fibroblastenkulturen mittels EC- (CD31) und FB-spezifischen (TE-7) Antikörpern vor der Verwendung dieser Zellen. Die dokumentierten stark positiven Reaktionen (Abb 3-1: rot-braune Anfärbung) bei der Anfärbung aller verwendeten Kulturlinien bestätigten dies.

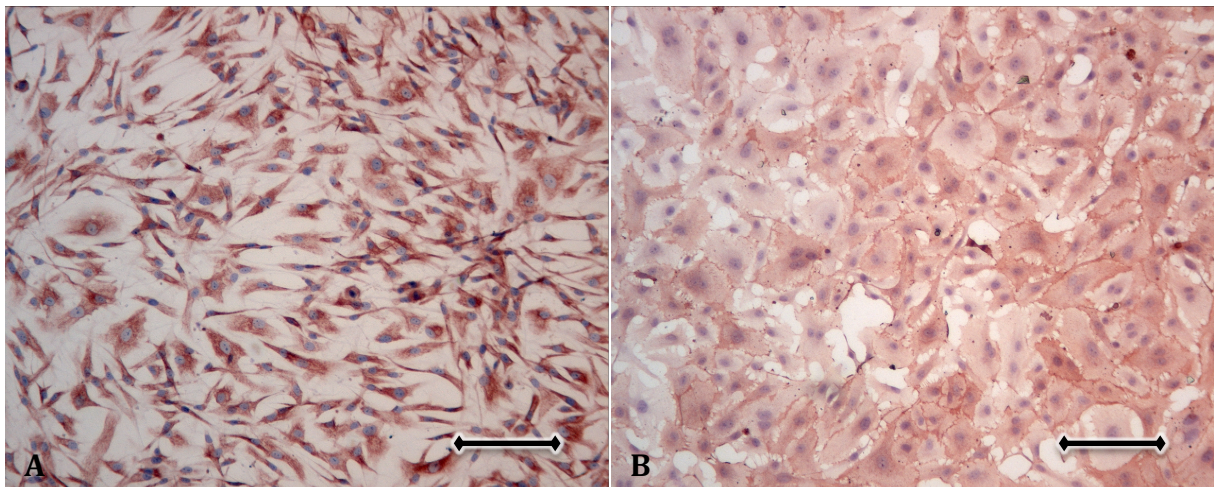


Abbildung 3-1: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von immunhistochemisch gefärbten Zellkulturen: Die Färbung der FB-Kultur mit dem FB-spezifischen TE-7-Antikörper zeigt starke positive Reaktionen an den Zellen und bestätigt die Anwesenheit von FBs (Bild A); Bei der Inkubation mit EC-spezifischem CD-31-Antikörper wird durch die positive Reaktion die Anwesenheit von EC bestätigt (Bild B); Maßstabsbalken = 20 μm .

4. Standardkurven der rt-PCR

I. IL-1a

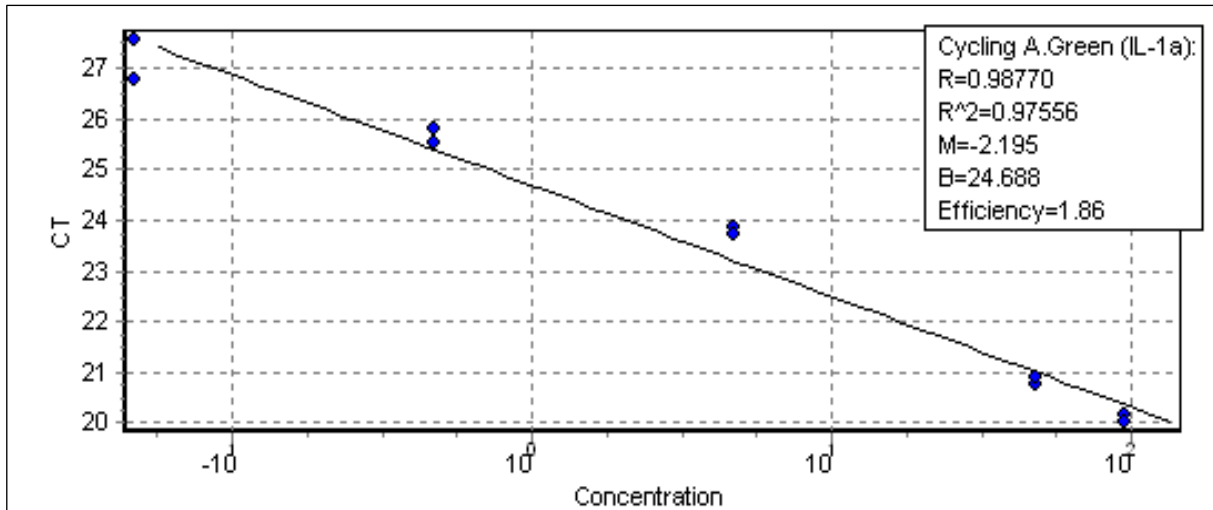


Abbildung 4-1; Konzentration des Primers IL-1a gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

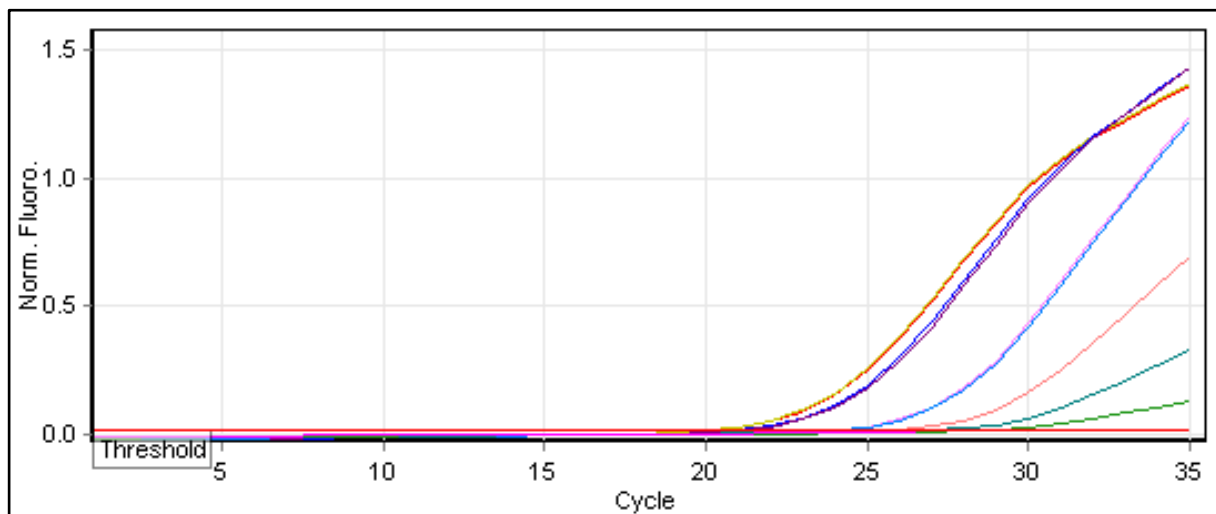


Abbildung 4-2; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

II. IL-6

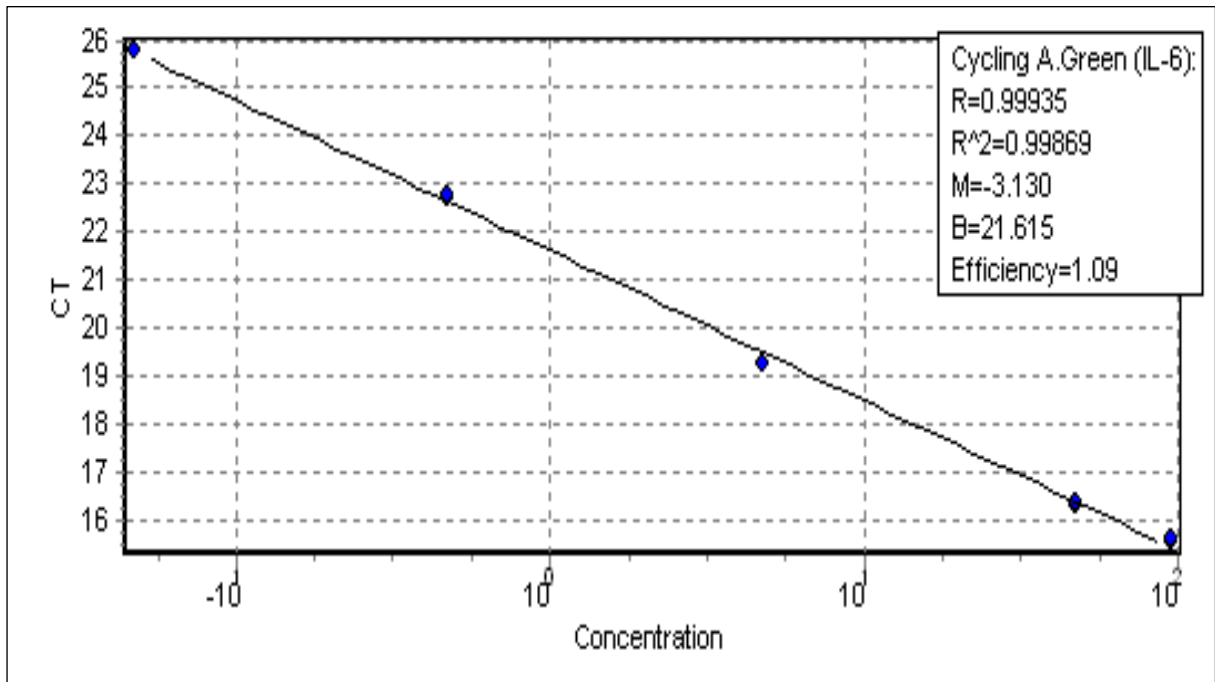


Abbildung 4-3; Konzentration des Primers IL-6 gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

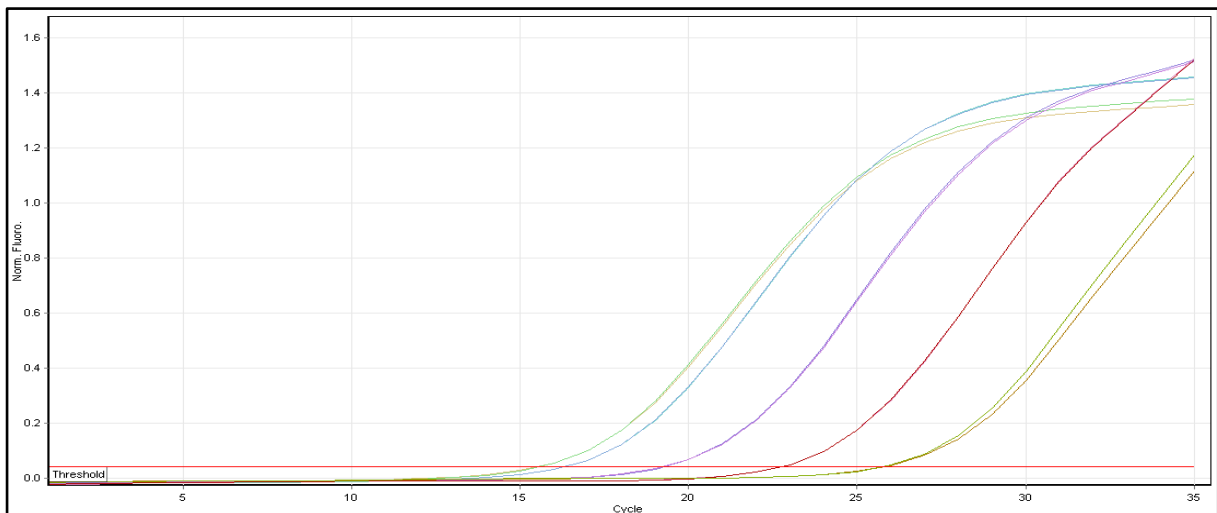


Abbildung 4-4; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

III. IL-8

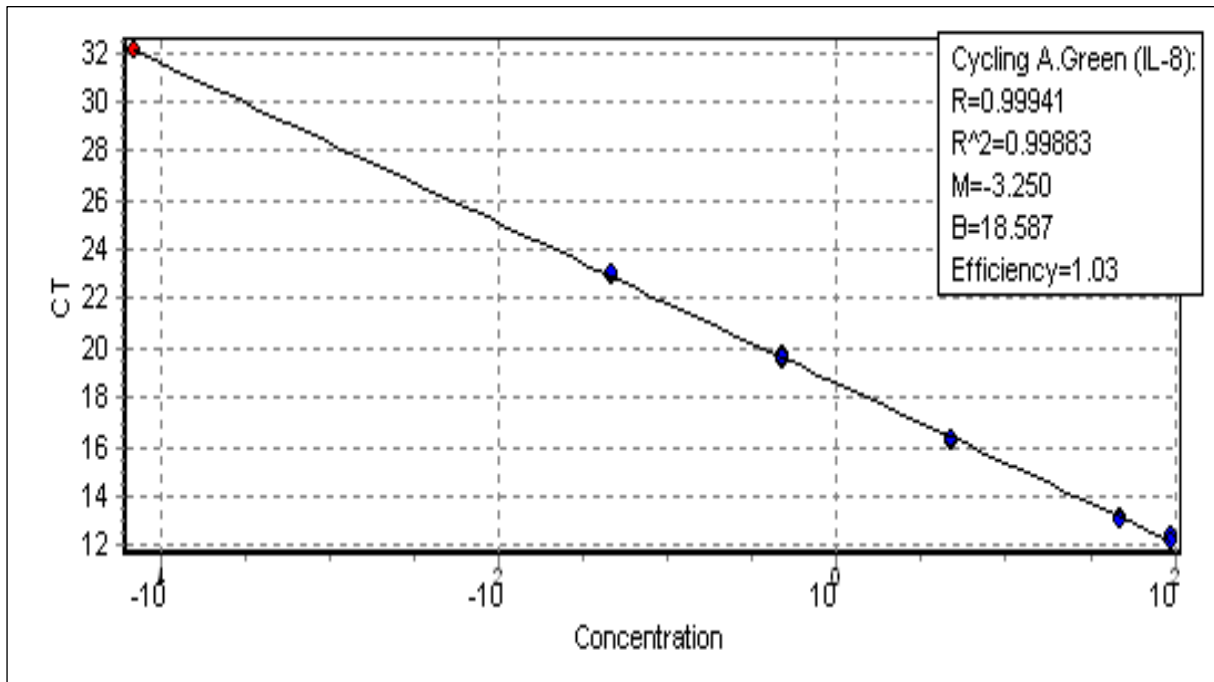


Abbildung 4-5; Konzentration des Primers IL-8 gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

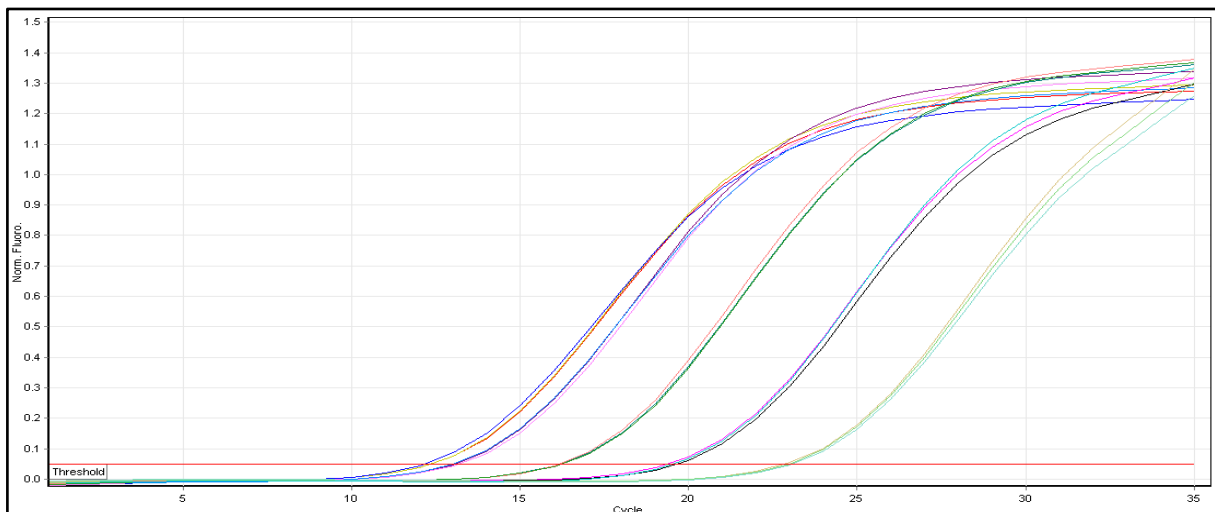


Abbildung 4-6; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

IV. MCP-1

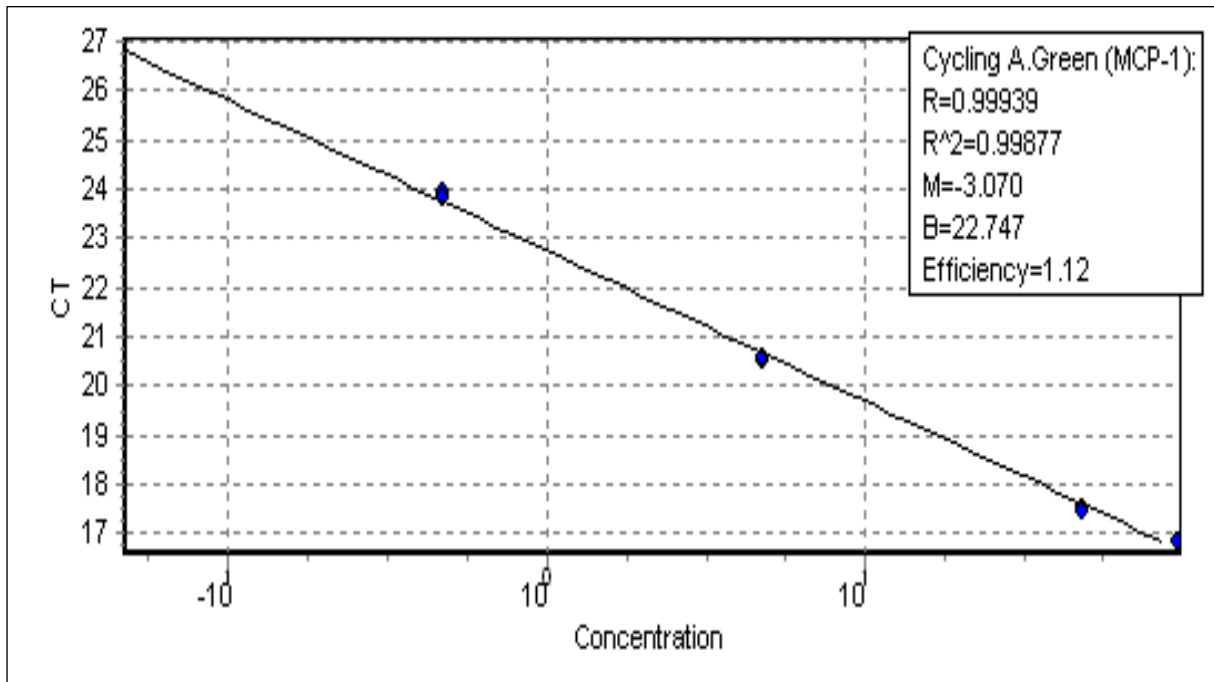


Abbildung 4-7; Konzentration des Primers MCP-1 gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

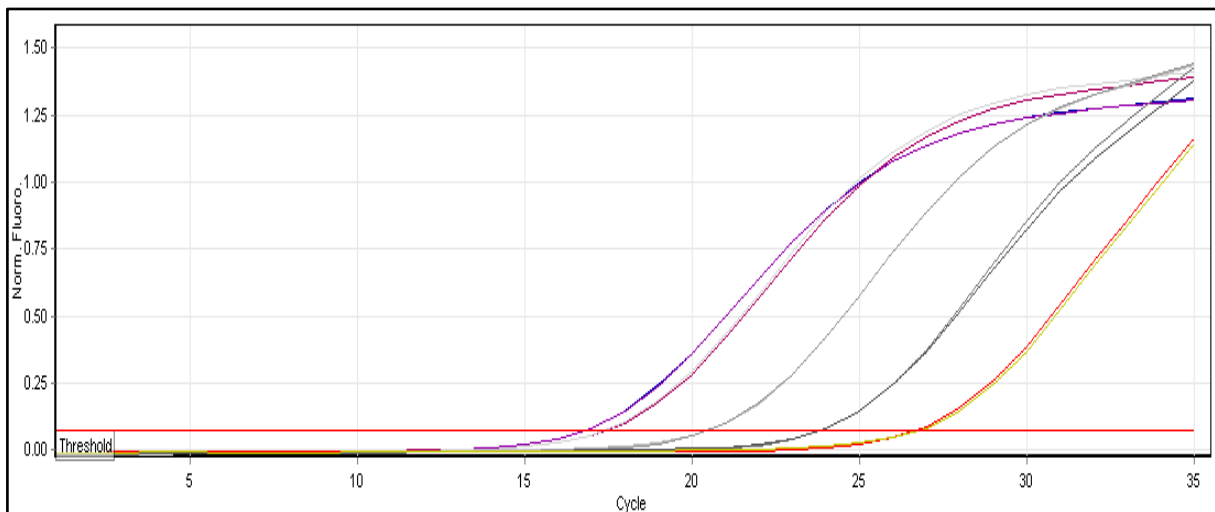


Abbildung 4-8; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

V. VCAM

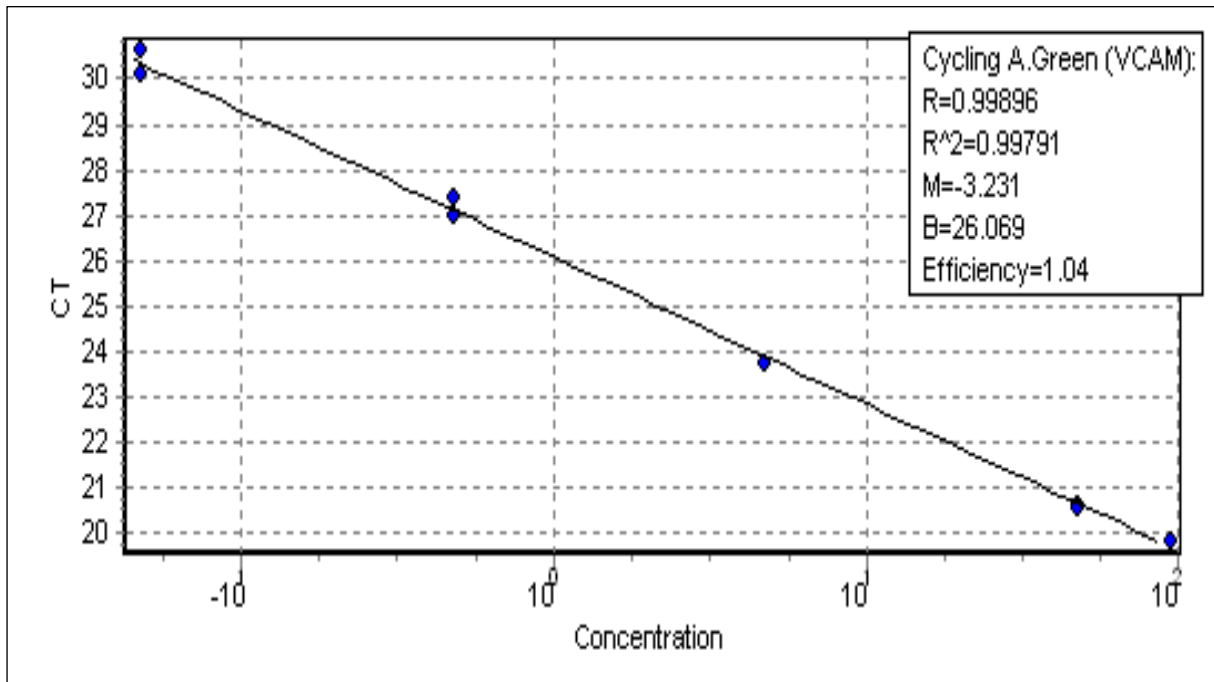


Abbildung 4-9; Konzentration des Primers VCAM gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

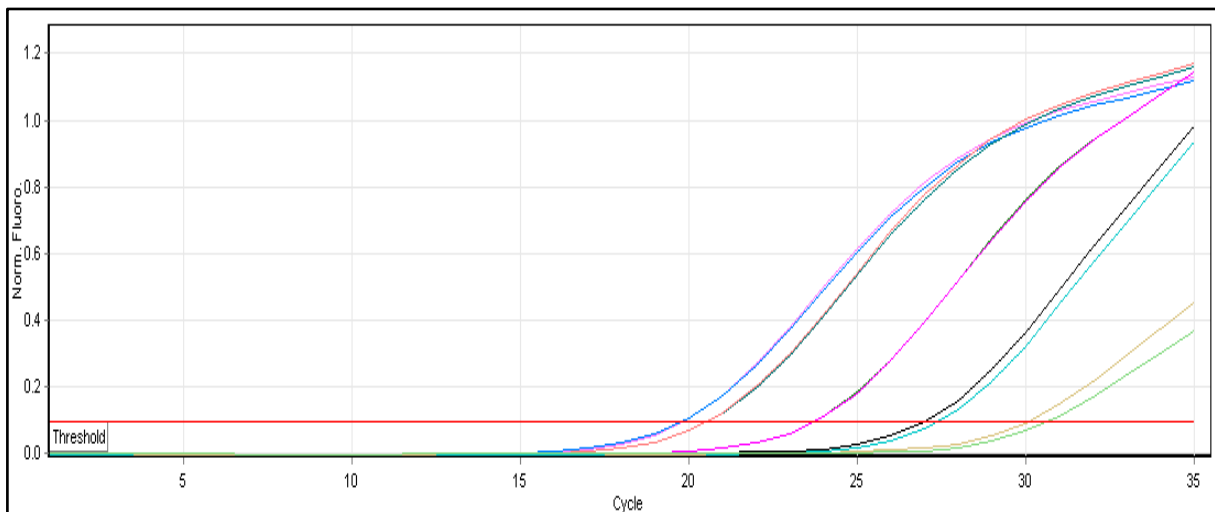


Abbildung 4-10; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

VI. GAPDH

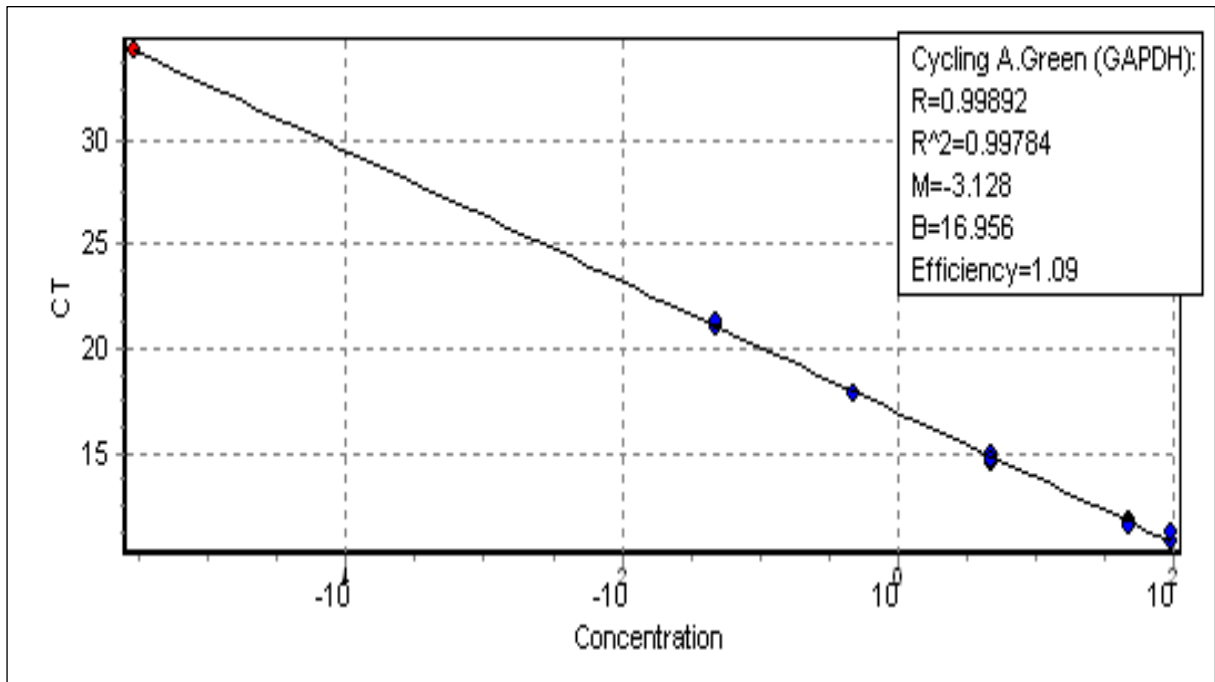


Abbildung 4-11; Konzentration des Primers GAPDH gegen den CT-Wert (Schnittpunkt mit dem Threshold) aufgetragen.

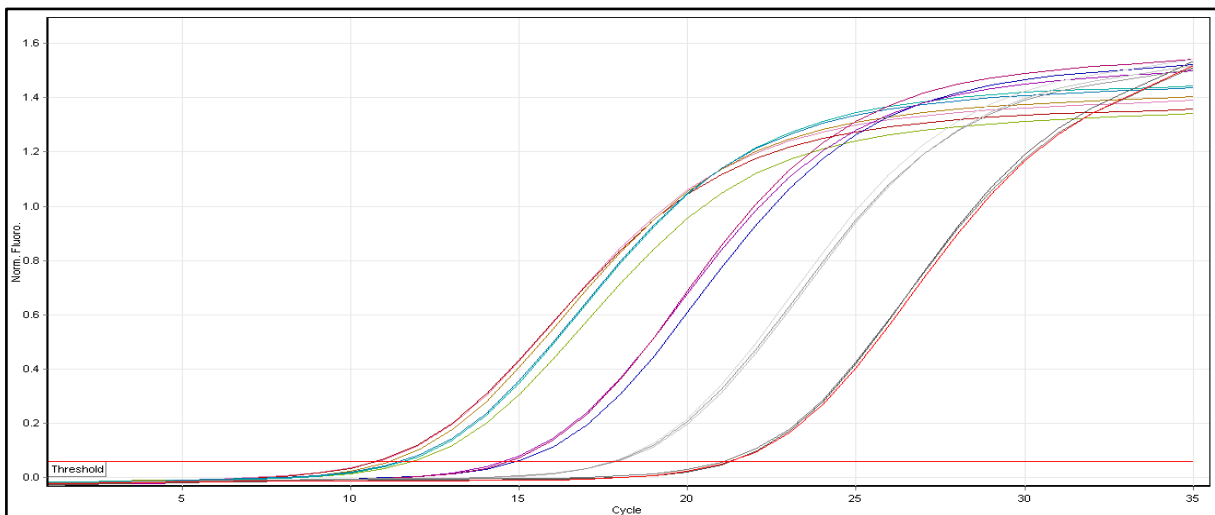


Abbildung 4-12; Anzahl der Replikationszyklen gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen; Doppelwerte weichen nicht signifikant voneinander ab.

5. Schmelzkurve

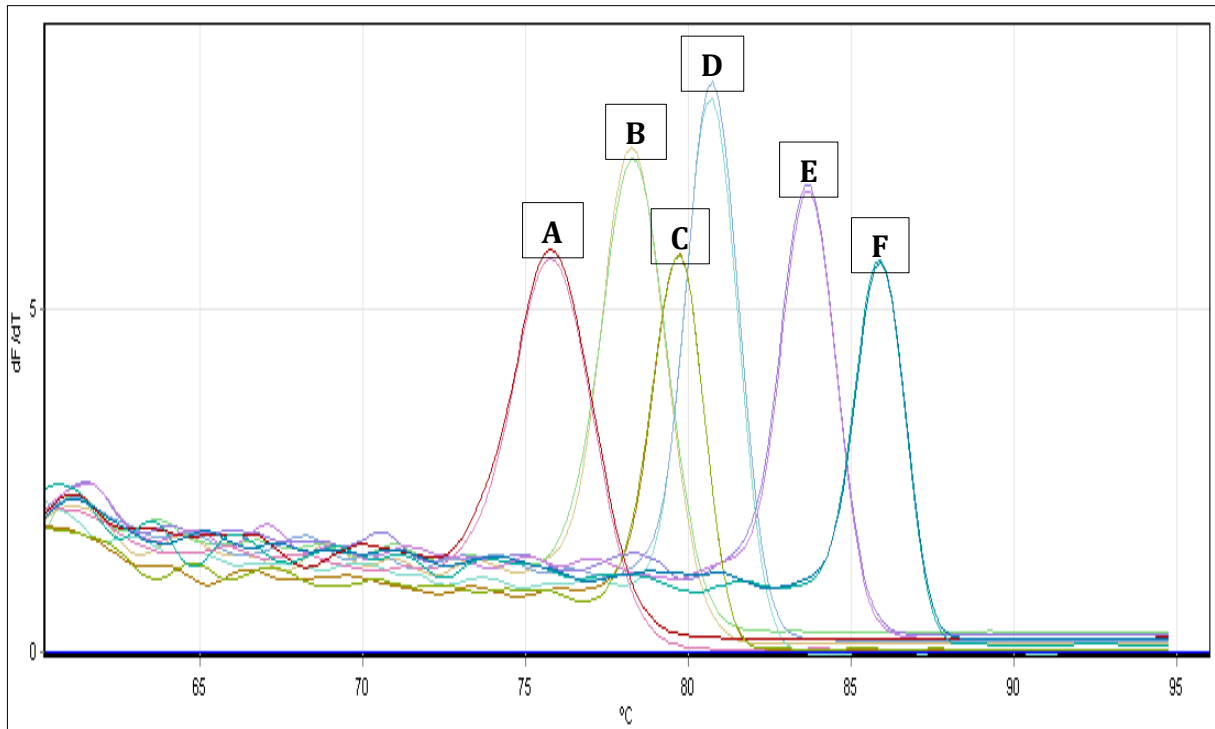
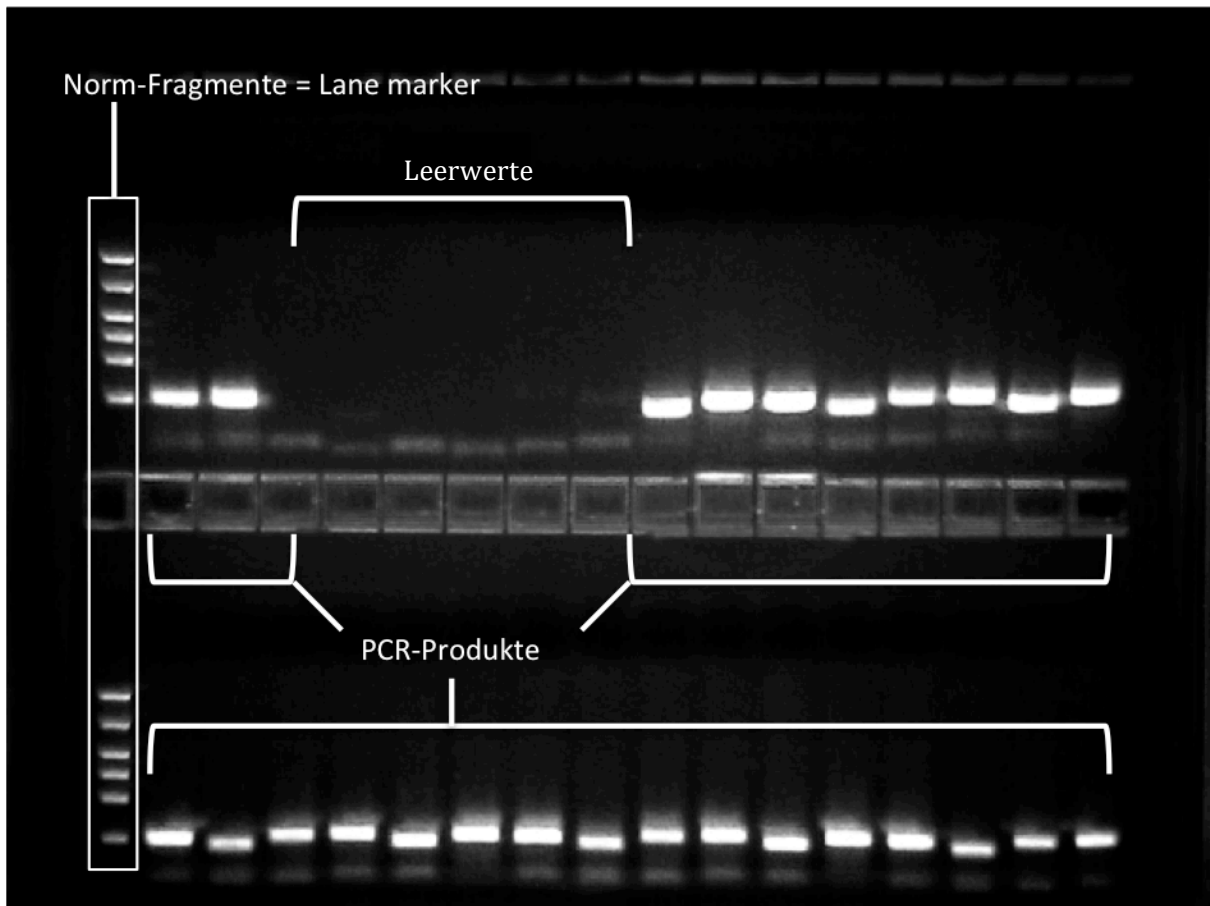


Abbildung 5-1; Repräsentative Schmelzkurve mit chemo-/ zytokinspezifischen Peaks; A: MCP-1; B: IL-1a; C: VCAM; D: IL-6; E: IL-8; F: GAPDH; Die Reinheit der PCR-Produkte wird durch den Verlauf der Kurven mit jeweils nur einem großen Peak bewiesen.

6. Gel-Elektrophorese

Aufnahme des Bandenmusters eines „Laufs“ der Gel-Elektrophorese mit PCR-Produkten und Leerwerten:



Anhand der Norm-Fragmente, welche vordefinierte Längen haben, ist eine Längenabschätzung der Fragmente der PCR-Produkte möglich; Schmale Einzelbanden sind ein Indikator für eine hohe Reinheit der PCR-Produkte; Die Abwesenheit von Banden bei den „PCR-Produkten“ der Leerwerte bestätigt die Spezifität der Messungen.

7. Abbildungen des weiterführenden Versuchs

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Proben des Zusatzversuches im Verlauf

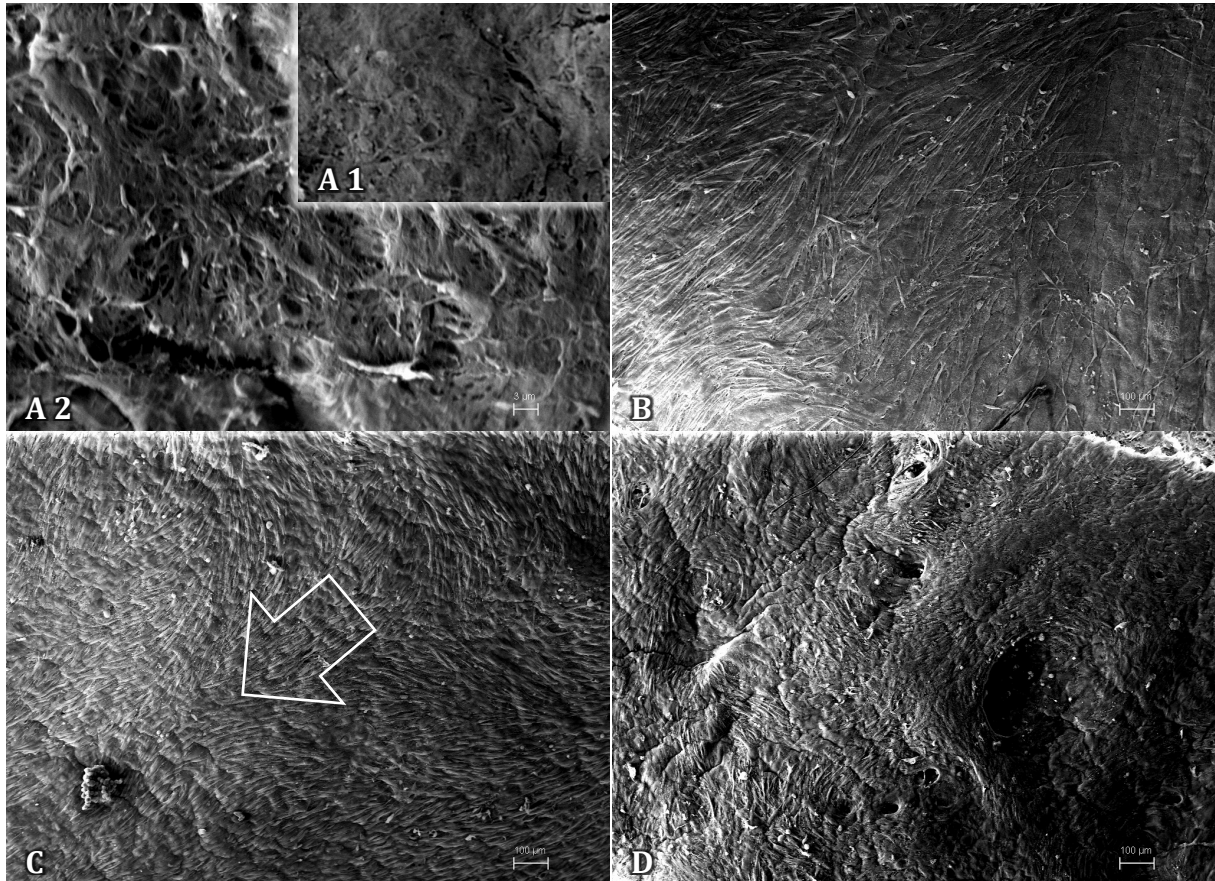


Abbildung 7 1; A 1: Eine glatte und homogene Oberfläche stellt sich auf der Nativprobe des Homografts dar (3700 x Vergrößerung); A 2: Nach dem 24-stündigen Dezellularisierungs-Schritt zeigt sich eine raue und faserige Oberfläche (3700 x Vergrößerung); B: Nach der FB-Besiedelung können die einzelnen FB anhand ihrer spindelförmigen Morphologie abgegrenzt werden; C: Lumenseitige Strömungsausrichtung der Zellen (siehe Pfeil) in Flussrichtung nach 12-tägiger Konditionierung von FB + EC; D: Die Außenseite des Homografts zeigt keine strömungsabhängige Zellausrichtung nach der Konditionierungsphase; Bilder B, C und D in 160 x Vergrößerung dargestellt.

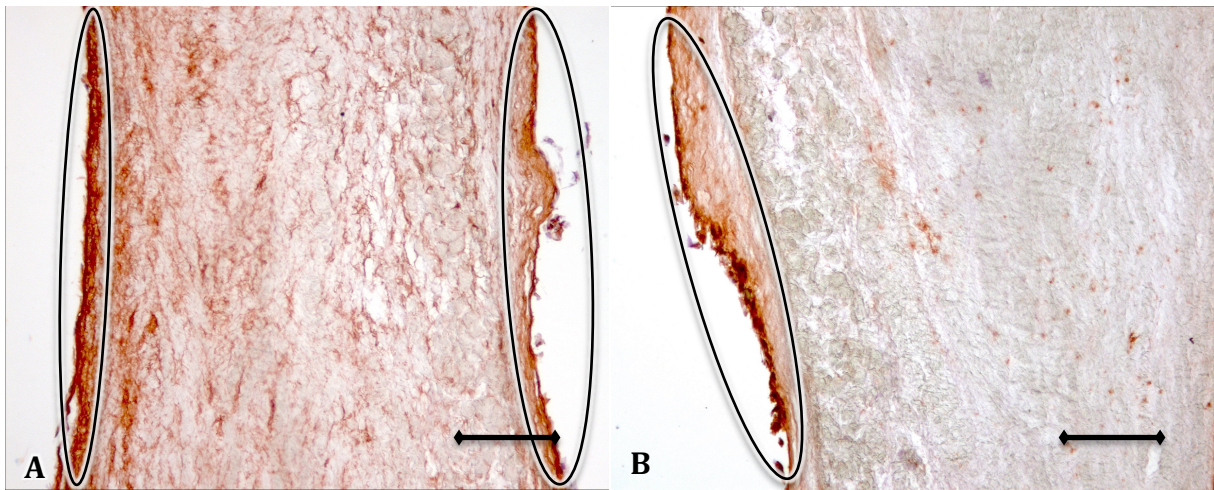
Immunhistochemische Färbungen von Proben des Zusatzversuches im Verlauf

Abbildung 7-1; A: Gegen Collagen IV gefärbte Proben nach der Konditionierungsphase zeigen eine starke positive Reaktion als oberflächlicher Randsaum der Probe. Eine verstärkte Ausprägung ist auf der flusszugewandten Seite zu erkennen; B: Die Färbung gegen Fibronectin zeigt ebenfalls positive Reaktionen, als oberflächlicher Randsaum dargestellt, nach Abschluss der Konditionierung; Maßstabsbalken = 100 μm .

Vorveröffentlichungen

In folgenden Originalartikeln und Kongressbeiträgen wurden bereits Teile dieser Dissertation publiziert:

Originalartikel in Fachzeitschriften:

- **Thierfelder N.**, Koenig F., Bombien R., Fano C., Reichart B., Wintermantel E., Schmitz C., Akra A., *In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning*. ASAIO journal, 2013. 59(3): p. 309-16.
- Haller N., Hollweck T., Koenig F., **Thierfelder N.**, Wintermantel E., Hagl C., Akra, B., *Low-flow conditioning of decellularized and re-seeded homografts in a novel pulsatile bioreactor*. Advances in Biomedical Engineering Research, Akzeptiert 2013 – Publikation in Vol 1, Iss 4.
- Aleksieva G., Hollweck T., **Thierfelder N.**, Haas U., Koenig F., Fano C., Dauner M., Wintermantel E., Reichart B., Schmitz C., Akra B., *Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering*. Biomedical engineering online, 2012. 11: p. 92.

Kongressbeiträge:

- **Thierfelder N.**, Haller N., Hollweck T., König F., Uhlig A., Haas U., Wintermantel E., Schmitz C., Hagl C., Akra B., *Long-time conditioning of re-seeded, dezellularized homografts for aortic valve tissue engineering*. Poster – Termis Jahrestagung 2012 / J Tissue Eng Regen Med 2012; 6 (Supl. 1): 1-429
- Akra B., Hollweck T., Koenig F., Borst L., Haas U., **Thierfelder N.**, Haller N., Pfeifer S., Wintermantel E., Schmitz C., Hagl C., *Bioreactors for heart valve tissue engineering*. Vortrag – ISB 2012

- **Thierfelder N.**, Aleksieva E., Uhlig A., Haas U., Koenig F., Bombien R., Fano C., Dauner M., Schmitz C., Reichart B., Akra B., *Aortic valve tissue engineering – synthetic vs. natural scaffolds*. Vortrag – Jahrestagung BMT 2011 / Biomed Tech 2011; 56 (Suppl. 1)

- **Thierfelder N.**, Akra B., Haas U., Koenig F., Aleksieva G., Bombien R., Fano C., Dauner M., Schmitz C., Reichart B., *Comparison of synthetic and natural scaffolds for application in aortic valve tissue engineering*. Poster - Jahrestagung DGTHG 2011 / Thorac cardiovasc Surg 2011; 59 - eP167

- Aleksieva E., **Thierfelder N.**, Uhlig A., Haas U., Koenig F., Bombien R., Fano C., Dauner M., Schmitz C., Reichart B., Akra B., *Methods of heart valve tissue engineering: static cultivation in comparison to dynamic cultivation*. Vortrag – Jahrestagung BMT 2011 / Biomed Tech 2011; 56 (Suppl. 1)

- Akra B., **Thierfelder N.**, Uhlig A., Haas U., Koenig F., Bombien R., Fano C., Dauner M., Schmitz C., Reichart B., *The effect of low shear stress on tissue engineered aortic heart valves*. Vortrag - Jahrestagung Termis 2011

- Akra B., Koenig F., Haas U., **Thierfelder N.**, Aleksieva G., Pfeifer S., Wintermantel E., Bombien R., Schmitz C., Reichart B., *A new seeding and conditioning bioreactor for heart valve tissue engineering*. Vortrag - Jahrestagung Termis 2011

Veröffentlichte Originalartikel:

Auf den folgenden Seiten sind die Originalartikel, in denen Teile dieser Dissertation bereits publiziert wurden aufgeführt. Die Übernahme der Artikel in diese Arbeit fand unter Berücksichtigung und in Übereinstimmung mit den Copyright-Richtlinien der Journals „*ASAIO*“, „*Advances in Biomedical Engineering Research*“ und „*Biomedical engineering online*“ statt.

In Vitro Comparison of Novel Polyurethane Aortic Valves and Homografts After Seeding and Conditioning

NIKOLAUS THIERFELDER,* FABIAN KOENIG,*† RENÉ BOMBIEN,* CORNELIA FANO,‡ BRUNO REICHAERT,* ERICH WINTERMANTEL,† CHRISTOPH SCHMITZ,* AND BASSIL AKRA*

The aim of the study was to compare the behavior of seeded cells on synthetic and natural aortic valve scaffolds during a low-flow conditioning period. Polyurethane (group A) and aortic homograft valves (group B) were consecutively seeded with human fibroblasts (FB), and endothelial cells (EC) using a rotating seeding device. Each seeding procedure was followed by an exposure to low pulsatile flow in a dynamic bioreactor for 5 days. For further analysis, samples were taken before and after conditioning. Scanning electron microscopy showed confluent cell layers in both groups. Immunohistochemical analysis showed the presence of EC and FB before and after conditioning as well as the establishment of an extracellular matrix (ECM) during conditioning. A higher expression of ECM was observed on the scaffolds' inner surface. Real-time polymerase chain reaction showed higher inflammatory response during the conditioning of homografts. Endothelialization caused a decrease in inflammatory gene expression. The efficient colonization, the establishment of an ECM, and the comparable inflammatory cell reaction to the scaffolds in both groups proved the biocompatibility of the synthetic scaffold. The newly developed bioreactor permits conditioning and cell adaption to shear stress. Therefore, polyurethane valve scaffolds may offer a new option for aortic valve replacement. *ASAIO Journal* 2013;59:309–316.

Key Words: tissue engineering, heart valve, homograft, cell conditioning, bioreactor, synthetic scaffold

Cardiovascular diseases are currently the major cause of death. With the growing global population and the increasing life expectancy, this problem will continue to grow. The number of patients requiring heart valve surgery will increase from 290,000 in 2003 to 850,000 in 2050.¹

From the *Department of Cardiac Surgery, Laboratory for Tissue Engineering, Grosshadern Medical Center, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany; †Institute of Textile Technology and Process Engineering, Denkendorf, Germany; and ‡Institute of Medical and Polymer Engineering, Technical University of Munich, Munich, Germany.

Submitted for consideration July 2012; accepted for publication in revised form January 2013.

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Reprint Requests: Dr. -Ing Bassil Akra, Department of Cardiac Surgery, Laboratory for Tissue Engineering, Grosshadern Medical Center, Ludwig-Maximilian-University of Munich; Marchioninstraße 15; 81377 Munich, Germany. Email: bassil.akra@med.uni-muenchen.de.

Copyright © 2013 by the American Society for Artificial Internal Organs

DOI: 10.1097/MAT.0b013e318289b95e

Currently, there are two different types of heart valve prostheses in use: mechanical and biological implants. Both types of implants offer the possibility to recover the normal valve-function, but unfortunately with a large number of limitations. On the one hand, mechanical prostheses require life-long oral anticoagulation therapy,² and on the other hand, the lifetime of the biological prostheses is limited.³ Therefore, it is necessary to develop a new kind of heart valve whose properties do not include the most critical disadvantages of the currently available prostheses. The development of a tissue engineered heart valve seems to be the most promising way: "Advantages of an engineered tissue heart valve would likely include non-thrombogenicity, infection resistance, and cellular viability."⁴

The field of tissue engineering has the aim of restoring diseased organs or lost functions by a combination of cells with scaffolds.⁵ Heart valve tissue engineering attempts, by an intelligent combination of these resources, to develop prostheses with a high durability and an inert surface, concerning coagulation. At the moment, three different approaches are used by research groups to achieve this aim. One possibility is the development of tissue engineered heart valves based on biodegradable scaffolds.⁶ The application of decellularized biological valves presents the second possibility.⁷ The development of a third cell-based option by using nondegradable scaffold materials is also under investigation.

The aim of the study was to compare new synthetic polyurethane (PU) scaffolds (group A) with conventional cryopreserved/thawed aortic homograft valves (group B) under analogous conditions in a newly developed bioreactor. Group B was used as a control group. The main interest was to study the reaction of seeded cells on variable materials to low flow shear stress after a short resting period of 24 hours.

Material and Methods

Cell Isolation and Cultivation

Saphenous vein segments, leftover from bypass operations, were used for vascular cell isolation. The study was approved by the Ethics Committee of Ludwig-Maximilian University Munich and before operation, patients gave their written informed consent for the use of their venous cells. Cells were isolated according to previously published methods.⁸ However, collagenase was replaced with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (10×; Sigma–Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany) to preserve the remaining fibroblast (FB) cell layer. First, the vein segments

were cannulated and rinsed with 500 ml M199 (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 1 ml heparin (5000 i.E.; Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 5 ml gentamycin (10 mg/ml; Invitrogen AG, Darmstadt, Germany). For endothelial cell (EC) isolation, the segments were filled with trypsin/EDTA solution and incubated for 25 minutes at 37°C. For FB isolation, the segments were incubated for 30 minutes at 37°C with 20 mg collagenase solved in 10 ml of human serum albumin (200 g/L; Baxter GmbH, Unterschleißheim, Germany). The obtained cells were initially cultivated in 12.5 cm² culture flasks in EC growth medium (ECGM; Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 6% fetal calf serum (Lonza GmbH, Köln, Germany) and 0.2% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) and FB growth medium (FGM; Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 11% fetal calf serum and 0.2% penicillin/streptomycin, respectively. Medium was changed every 2–3 days. Cells were passaged at confluency.

Scaffolds

Polyurethane valves (group A, n = 4; **Figure 1A**) and homografts (group B, n = 4; **Figure 1B**) were used as scaffolds for the development of a new tissue engineered heart valve.

Polyurethane scaffolds. Polyurethane scaffolds with a diameter of 24 mm were manufactured by a spraying technique (patent DE 28 06 030 C2). Randomly oriented PU fibers were measured to have a median diameter of 1.55 μm (**Figure 3A**). The fibers formed a sheet with a thickness of 0.3 mm. Surface modification was not realized for the cell-seeding procedure. For seeding purpose, PU scaffolds were sent to a certified sterilization supplier and were γ-sterilized at 10 kGy. For safe handling, the scaffolds were fixed to a special Teflon (Sahlberg GmbH&Co. KG, Munich, Germany) mounting (**Figure 1C**) by a continuous circular suture using a surgical thread (Suprolene 3/0, Resorba GmbH, Nürnberg, Germany) prior to cell seeding. The mounting was designed for application in the seeding device and the conditioning bioreactor.

Homografts. Heart valve donors had an average age of 52.25 ± 5.74 years at the date of explantation. Exclusion criteria

for the experiment were any signs of insufficiency or any macroscopic damage. Average storage time was 7.33 ± 2.11 years. Cryopreservation of the homografts was performed according to previously published methods.⁹ Scaffolds with a diameter of 27 mm were thawed in Ringer solution at 56°C and washed in Earle's M199 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 2 hours at room temperature (RT). Homografts were sutured to the Teflon mounting (**Figure 1C**) by single stitches using a surgical thread (Suprolene).

Cell Seeding and Conditioning

For better endothelialization results, the scaffolds were pre-seeded with FB, followed by colonization with EC. The seeding procedure using a 3D rotating seeding device (**Figure 2A**) was performed as previously described.^{9,10} Briefly, 92.11 ± 11.08 × 10⁶ FB (difference of counted cells in the suspension before and after seeding procedure) in 100 ml supplemented FGM were dynamically seeded onto the native scaffolds for 24 hours (running phase: 2.5 minutes; holding phase: 30 minutes). Gas exchange was ensured by a silicone membrane. After FB seeding, the scaffolds were transferred to a glass bin containing 200 ml fresh supplemented FGM and were cultured for 24 hours under static conditions. In the following 5 days, the valves were incubated in a novel self-made conditioning bioreactor (EU-Patent pending; EP10166094.2; **Figure 2B**).¹¹ During this period, the valves were perfused with 400 ml supplemented FGM by an increasing sinusoidal pulsatile flow for 48 hours at 750 ml/min (≈24 bpm) and 72 hours at 1100 ml/min (≈35.5 bpm). Half of the supplemented FGM was exchanged after 2 days. The conditioning period was followed by a second seeding procedure for the EC (96.48 ± 8.05 × 10⁶ cells). The EC seeding, the subsequent second resting period, and the final conditioning procedure were performed as described for FB; however, supplemented ECGM was used for cell nutrition. The performance of the valve leaflets was controlled and documented using an endoscope (**Figure 2B5**).

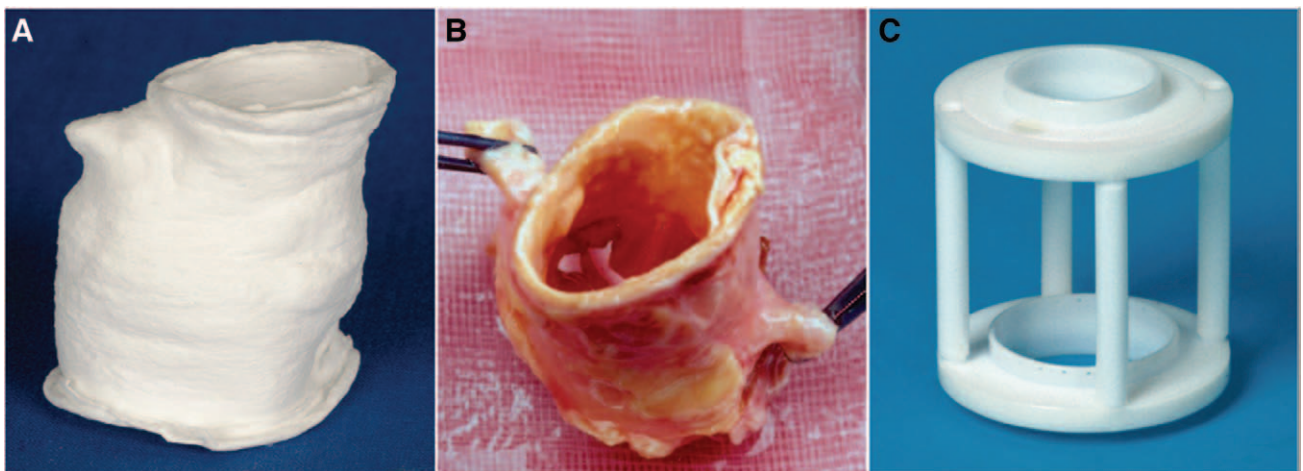


Figure 1. **A:** Sprayed polyurethane (PU) scaffold, diameter: 24 mm, group A (n = 4). **B:** Cryopreserved/thawed homograft, diameter: 27 mm, group B (n = 4). **C:** Teflon mounting for valve fixation in the seeding device and the conditioning bioreactor. Valves were fixed with a surgical thread in a continuous suture technique (polyurethane), respectively, single stitches (homograft).

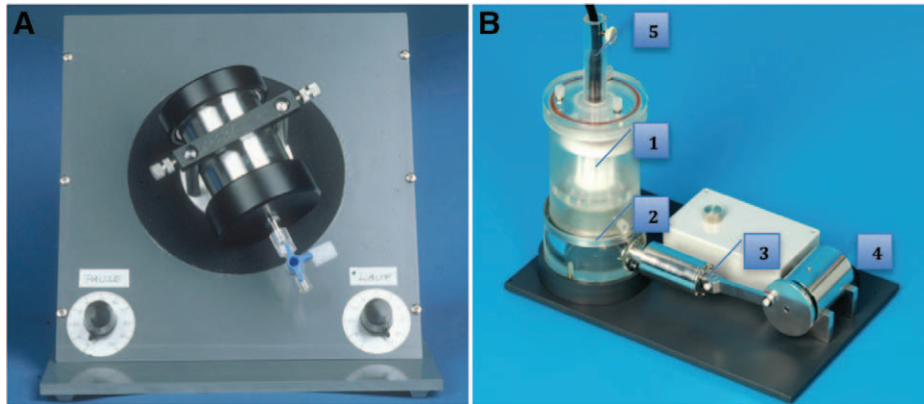


Figure 2. **A:** Bioreactor for 24 hours 3D cell seeding (running phase = 2.5 min, holding phase = 30 min).¹⁰ **B:** Bioreactor for 5 day conditioning period¹¹ (750–1100 ml/min). **B1:** Mounting with polyurethane scaffold placed in the incubation chamber filled with 400 ml culture medium during the experiment. **B2:** Silicone membrane for conduction of pulsatile movement to the culture medium. **B3:** Piston for generation of pulsatile movements. **B4:** Electronic motor with eccentric piston rod. **B5:** Endoscope for the monitoring of valve performance.

Evaluation Methods

Scanning electron microscopy (SEM), immunohistochemistry (IHC), and real-time polymerase chain reaction (PCR) were used for evaluation. Samples were taken from veins, cell cultures, and native scaffolds, before and after each processing step. After the second conditioning period, samples were taken from the supravalvular, valvular, and subvalvular region of the aortic wall as well as from the valvular cusps.

SEM evaluation. For this procedure, the samples were fixed in a solution of 456 ml aqua bi-distilled (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., Germany), 0.75 ml 1 N hydrochloric acid (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 43.5 ml glutaraldehyde, and 5.65 gm sodium cocodylate trihydrate (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 4°C for a minimum of 48 hours. Subsequently, they were dehydrated by an ascending ethanol series (30, 50, 70, and 96%) and 100% acetone (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), followed by critical point drying and gold sputtering (28 mA; 570V) of 180 s at 10^{-5} mbar. A “Zeiss Evo LS 10” (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) scanning electron microscope was used for microscopy and documentation.

IHC analysis. In IHC evaluation, an indirect staining method was used. After at least 3 days of fixation time in a formalin solution (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), the samples were embedded in paraffin and sectioned with a thickness of 10 μ m. In a few interim stages, the paraffin was washed out, the cell membrane was permeabilized, and the antigens were unmasked. Samples were incubated for 16 hours at 4°C with monoclonal mouse antibodies (AB) against cluster of differentiation (CD)31 (dilution: 1:30; Dianova GmbH, Hamburg, Germany), Human Thymic Fibroblasts Antibody (TE)-7 (0.1 mg/ml; Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach, Germany), smooth muscle cell (SMC)-myosin (954 mg/L; DakoCytomation, Hamburg, Germany), -actin (44 mg/L; DakoCytomation), vascular endothelial (VE)-cadherin/CD144 (0.2 mg/ml; Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany), connexin-43 (1 mg/ml; Chemicon-Millipore GmbH), fibronectin (0.6 mg/ml; Sigma–Aldrich GmbH), intercellular adhesion molecule (ICAM; clone: W-CAM-1; dilution: 1:20; Chemicon-Millipore GmbH), CD106 (200 μ g/ml;

Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany), and collagen IV (5.4 mg/ml; Sigma–Aldrich GmbH). In the following step, the samples were incubated for 30 minutes at RT with the second AB (Dual Link System-HRP, Dianova GmbH). This horseradish-peroxidase-linked AB allowed the visualization of the AB complexes. Furthermore, nuclear counter staining with Mayer’s hemalum solution (Merck, Darmstadt, Germany) was performed.

PCR evaluation. Samples, stored in liquid nitrogen, were used for the RNA isolation using RNeasy Plus Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s protocol. The purity and quantity of the RNA were measured by photometry (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Reverse transcription (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen GmbH) was performed according to Qiagen protocol. For PCR, a Rotor-Gene Q 2plex System (Qiagen GmbH) with SYBR Green detection was used. To determine the primer concentration, a dilution series (1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) for standard curve graphing was compiled. During measurement, 35 replication cycles were performed, including, respectively, one negative control using water instead of the primer. Temperatures of 95°C (10 seconds) in the denaturation phase and 60°C (30 seconds) in the replication phase were used. The expressions of interleukin (IL)-1a (QuantiTect Primer Assay IL-1a, Qiagen GmbH), IL-6 (QuantiTect Primer Assay IL-6, Qiagen GmbH), IL-8 (QuantiTect Primer Assay IL-8, Qiagen GmbH), monocyte chemotactic protein (MCP)-1 (QuantiTect Primer Assay CCL2, Qiagen GmbH), vascular cell adhesion molecule (VCAM; QuantiTect Primer Assay VCAM, Qiagen GmbH), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; QuantiTect Primer Assay GAPDH, Qiagen GmbH) were measured. The obtained Ct-values were normalized to the housekeeping gene GAPDH. The specificity of the PCR products was checked by melting curve analysis (from 60–90°C; +1°C/10sec) and gel electrophoresis (FlashGel System, Lonza GmbH, Cologne, Germany).

All values are expressed as means \pm standard deviation. Student’s t-test was performed for comparison of data; the probability value $p < 0.05$ was considered significant.

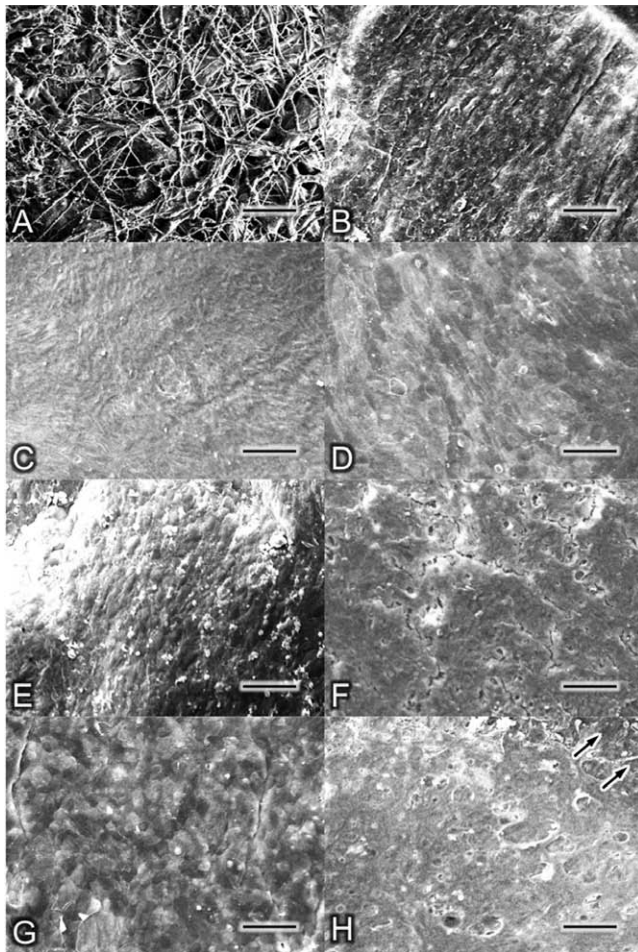


Figure 3. **A:** Native samples of polyurethane (PU) scaffolds demonstrated randomly orientated fibers with a median diameter of 1.55 μm . **B:** Native samples of the homografts showed an abrasive surface with some cell fragments. **C:** Complete coverage of the PU fibers after fibroblasts (FB) seeding. The typical fusiform shape of FBs is recognizable. **D:** Smooth and homogenous surface after FB seeding due to a complete coverage of the scaffold. **E:** Endothelial cell (EC) seeding of PU scaffolds resulted in a confluent cellular coverage with the characteristic cobblestone pattern. **F:** EC seeding of the homografts also generated a confluent EC layer. The fissures found on the scaffold are dehydration artifacts. **G:** A cobblestone-like relief indicates a confluent endothelial lining of PU scaffolds after the second conditioning period. **H:** Homografts were also covered with EC after conditioning. A few areas revealed marginal damage (black arrows); samples **C**, **D**, **E**, and **F** were taken after the resting period (24 h after conditioning). Samples **G** and **H** were taken directly after the second conditioning period; scale bars: **A** = 20 μm , **B–H** = 150 μm .

Results

Topography of the Scaffolds Surface

SEM analysis was performed to assess the topography of the cell layer. The recordings showed an uneven, abrasive but homogenous surface in the native samples of both groups (**Figure 3**, **A** and **B**). The structure of the sprayed randomly orientated PU fibers (group A) was clearly visible (**Figure 3A**).

After FB seeding procedure, a nearly confluent cell layer was visible in both groups. On homograft surfaces at few positions, the cells were not clearly identifiable. Overall, the surface

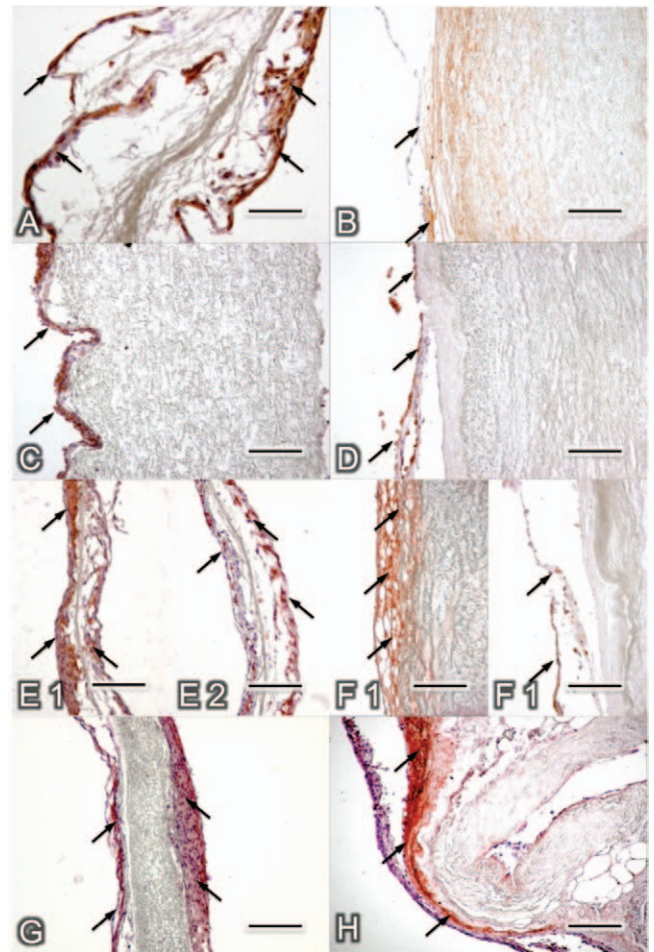


Figure 4. After fibroblasts (FB) seeding, TE-7 staining displayed a compact and confluent FB layer on polyurethane (PU) scaffolds (**A**; arrows); and a thin cell layer on homografts (**B**; arrows); staining against CD31 revealed successful endothelial cells (EC) seeding on PU scaffolds (**C**; arrows) and on homografts (**D**; arrows). After the final conditioning period, confluent cell layers of FB were detected on PU (**E1**; arrows) and on homografts (**F1**; arrows) by staining against TE-7. The presence of EC on the surface of the PU (**E2**; arrows) and of the homografts (**F2**; arrows) was demonstrated by CD31 staining. The establishment of a distinct extracellular matrix during the second conditioning period was found by positive staining against Collagen IV on polyurethanes (**G**; arrows) and homografts (**H**; arrows). Cell nuclei were stained with hemalaun (purple); scale bars: 300 μm . CD, cluster of differentiation; TE, human thymic fibroblasts antibody.

appeared smoother and in group A, the PU fibers were completely covered with cells. Partially the fusiform shape of the FB was recognizable (**Figure 3**, **C** and **D**).

The structure of the surface in both groups seemed to be changed after cellularization with EC. The seeded endothelial layer appeared as a cobblestone surface. In group A, a totally confluent cell layer was visible (**Figure 3E**). In group B, a nearly confluent cell layer was observable; however, several small unseeded regions were noticeable (**Figure 3F**).

At the end of the second conditioning period, the samples showed a slightly different sight. On several spots the surface of the conditioned homografts seemed lacerated (**Figure 3H**, arrows). In group A, a few PU fibers were visible. However, nearly the entire surface was covered with a cobblestone-like

Table 1. Pooled IHC Staining Results

	Cell Culture		Nativ Scaffold	After FB Seeding	After EC Seeding	After EC Conditioning
	EC	FB				
Group A						
CD 31	+++	0	ND	0	+++	+++
TE-7	0	+++	ND	++	+	+++
SMC-myosin	ND	ND	ND	0	0	0
α -actin	ND	ND	ND	+	+	+++
VE-cadherin	ND	ND	ND	+	+	+++
Connexin-43	++	ND	ND	0	+	+
Fibronectin	ND	+++	ND	+	+	+++
ICAM	ND	ND	ND	+	++	+++
CD 106	ND	ND	ND	0	0	+
Collagen IV	ND	++	ND	+	++	+++
Group B						
CD 31	+++	0	0	0	++	++
TE-7	0	+++	0*	+	++*	++*
SMC-myosin	ND	ND	0*	0*	0*	+
α -actin	ND	ND	0*	+	+	++*
VE-cadherin	ND	ND	0	0	+	++
Connexin-43	++	ND	0	+	+	+
Fibronectin	ND	+++	0*	0*	+	+++*
ICAM	ND	ND	0*	+	++	++*
CD 106	ND	ND	0	0	0*	+
Collagen IV	ND	++	0*	0*	+	+++*

0 denotes no staining visible; +, light staining; ++, moderate staining; +++, strong staining.

*Positive reaction on scaffold material.

CD, cluster of differentiation; EC, endothelial cells; FB, fibroblasts; ICAM, intercellular adhesion molecule; IHC, immunohistochemistry; ND, not done; SMC, smooth muscle cell; TE, human thymic fibroblasts antibody; VE, vascular endothelial.

cell layer (**Figure 3G**). The cusps were completely coated with a continuous cell layer.

Protein Expression

The presence of EC and FB in the respective cell cultures was displayed by staining against CD31 (EC antibody) and TE-7 (FB antibody). Cell nuclei were stained with hemalaun (A–H purple). The native samples of group B showed no superficial cell layer stainable by hemalaun, but some positive reactions in the internal space of the scaffold wall. Additionally, staining against fibronectin and collagen IV (extracellular matrix [ECM] specific) evoked a strong reaction.

Staining of FB-seeded scaffolds displayed a moderately positive reaction of TE-7 AB, pointing to a successful FB seeding procedure (**Figure 4, A and B**; arrows). ICAM and α -actin ABs also showed a lightly positive reaction (**Table 1**). The moderately positive reaction of CD31 AB (**Figure 4, C and D**; arrows) after the EC seeding procedure suggested successful seeding of EC in both groups. ICAM and collagen IV expression increased, as shown by a stronger staining reaction (**Table 1**). Strong positive peroxidase reactions in the staining against TE-7 and CD31 of both groups after the second conditioning procedure confirm the unchanged presence and integrity of the FB and EC layers, respectively (**Figure 4, E1, E2, F1, F2**; arrows). An enhancement of ECM and cellular adhesion after the EC conditioning period was detected by a strong, intensified positive reaction of α -actin, VE-cadherin, fibronectin, ICAM, and collagen IV (**Figure 4, G and H**, arrows; **Table 1**). A higher expression of ECM was observed on the scaffold's inner surface.

Gene Expression

Figure 5 demonstrates the mean values of gene expression before and after the conditioning period of FB-seeded as well as FB- and EC-seeded PU valves and homografts, respectively. Gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The analysis of different segments of the heart valves (aortic wall and cusps) in both groups showed equivalent gene expressions for all cytokines and chemokines.

IL-1a and VCAM presented a negligible expression in both groups during the whole experiment. Negligible pro-inflammatory gene expression change of IL-6 (–1.12%) was detected while the seeded FB layer in Group A (**Figure 5A**) was conditioned, whereas the level of IL-8 gene expression decreased (–59.48%) and an increase of MCP-1 (+138.78%, $p < 0.05$) was detected during the conditioning of FB in group A. An increase in the expression of most genes was observed (IL-6: +122.61%; IL-8: +454.38%; MCP-1: +45.39%) in group B (**Figure 5B**).

In both groups, the endothelialization caused a decrease in inflammatory cell response (group A, **Figure 5A**: IL-6: –78.82%; MCP-1: –68.71%; group B, **Figure 5B**: IL-6: –97.42%; IL-8: –67.01%; MCP-1: –89.44%, $p < 0.05$). For IL-8 in group A only, an increase of +559.7% ($p < 0.05$) was observed. Nonetheless, IL-8 expression after endothelialization is slightly lower than that in group B.

During the second conditioning step of the scaffold colonized with FB and EC, a slight decrease in IL-8 (group A, **Figure 5A**: –66.23%; group B, **Figure 5B**: –13.98%) was observed. IL-6- and MCP-1 expression was approximately on the same level in this period.

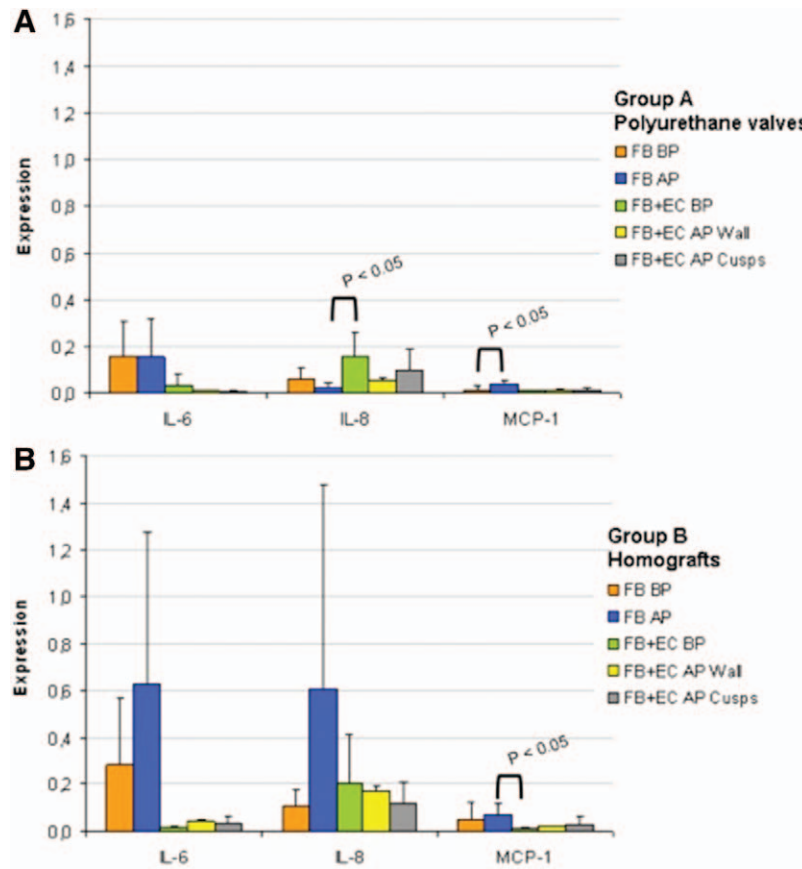


Figure 5. Cyto- and chemokine expressions of fibroblast and fibroblast-endothelial cell seeded scaffolds before (BC) and after conditioning (AC) **A:** Gene expression of interleukin (IL)-6, IL-8, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 in cells seeded onto polyurethane valves: fibroblasts (FB) conditioning induced a decrease in IL-8 and an increase in MCP-1 expression. IL-6 expression remained at a constant level. The endothelialization step caused decrease in IL-6 and MCP-1 expression. Measured IL-8 increased in this step, which regresses in the following conditioning step. For IL-6 and MCP-1 no significant change was observed during endothelial cell (EC) conditioning. **B:** Gene expression of IL-6, IL-8, and MCP-1 in cells seeded on homografts: conditioning of FB causes an increase of the gene expression of IL-6, IL-8, and MCP-1, which is regressive after EC seeding. EC conditioning does not cause a significant change in gene expression. No significant difference was found between the gene expression of cells in aortic walls and cusps in either group; samples were taken directly BC and AC periods; values are normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Discussion

The mean age of patients requiring cardiac valve replacement increases every year.¹² Therefore, the most beneficial form of therapy seems to be the extraction and the use of adult cells with good cultivation characteristics for the manufacturing of a tissue engineered heart valve. It has already been described that cells of aortic valvular origin appear as one of the most suitable cell types for aortic valve tissue engineering; however, there is no reasonable mode of autologous application.¹³ On the other hand, cell source comparisons, also performed in our department,¹⁴ have shown excellent results for cells isolated from saphenous vein segments.^{15,16} Corresponding to these results, a specific isolation of EC and FB from saphenous vein segments was possible, a good replication rate in cell culture enabled a fast usage, and good conditioning attributes were observed. Considering these arguments, this cell source seems to be a good consensus concerning a practicable harvesting and the creation of a durable and viable tissue engineered aortic valve for an autologous application.

In the choice of the scaffold, several reasons militated for taking a nondegradable material, such as PU, for a tissue

engineered aortic heart valve. Polyurethane is known as one of the most bio- and hemocompatible materials used in the development of medical devices.¹⁷ However, aging of PU has been found to be a possible drawback of this material in clinical studies. Nevertheless, its degradation rate is significantly lower than that of most degradable materials used for tissue engineering applications (e.g., polyglycolic acid and polylactic-coglycolic acid).^{18,19} Another reason against degradable scaffolds is the high pressure stress in aortic position, meaning that proper function and a high life expectancy cannot be guaranteed.^{20,21} Under these conditions, just decellularized homografts showed a promising *in vivo* short- and mid-term performance.^{22–24} Baraki *et al.*²³ showed in their comparison between decellularized homografts and a native control group that the decellularized valves had even a better outcome concerning morphology and function after 9 months in systemic circulation. A drawback of this kind of scaffold is, however, the limited availability of homografts.²⁵ Up to now, synthetic degradable materials proved their qualification only in pulmonary arterial position.⁶ The uncontrollable absorbability and the possible inflammatory reaction during the resorption time are additional arguments against biodegradable materials.^{4,26}

The untreated cryoconserved/thawed homografts, which are established prostheses in modern heart surgery, were used as a control group in our study. In this way, it was possible to compare the behavior of seeded cells on native tissue and synthetic scaffold. The absence of endothelial and interstitial cells on native homografts surface, shown by negative CD31- and HE-staining results, could be explained by the cryopreservation process. Confirming these results, Lupinetti *et al.*²⁷ showed that cryopreservation of homografts can result in a severe loss of EC coverage.

In all experiments, both scaffold materials showed an adequate cell-seeding efficiency and presented a nearly completely confluent FB cell layer on the surface. The already described preseeding with FB resulted in a good subsurface for a confluent EC layer with good cell adherence.¹² The achieved intact endothelial surface plays a decisive role for the avoidance of the anticoagulation therapy in a following *in vivo* use.² Additionally, the endothelialization caused a desirable decrease in IL-6 and MCP-1 gene expression in both groups. Due to the known importance of these cytokines and IL-8 on inflammatory reaction, a downregulation in a target-cell-free surrounding is crucial.^{28,29} A low inflammatory cell response plays *in vivo* a decisive role in the healing process after a heart valve implantation and the long-term functionality of a bio-prosthetic valve.³⁰ However, IL-8 is also known as a pro-proliferative, a pro-angiogenic, and anti-apoptotic cytokine.^{31,32} This might explain the persistent expression after endothelialization and during the second conditioning period.

An essential component of each tissue is a specific ECM.³³ To provoke the establishment of an ECM by the seeded cells of a tissue engineering construct, an appropriate stimulus is necessary. In cardiovascular tissue engineering, Jockenhoevel *et al.*³⁴ and other research groups showed that flow-depending mechanical stress induces ECM formation.³⁵ In line with these results, the establishment of an ECM and the habituation of the cells were observed during the 5-day conditioning periods, demonstrated by positive staining against collagen IV and fibronectin. An increased ECM growth on scaffolds' inner/flow surface proved the flow dependence. The major construction of the ECM was observed during EC conditioning and due to the increased inflammatory influence, the first conditioning period did not appear to be beneficial. Additionally, the desired effect of downregulation of chemotactic factors, such as IL-8 and MCP-1,²⁹ was mainly observed after endothelialization. So, longer resting periods and longer EC conditioning for a further decrease in inflammatory cell reaction and less possible arteriosclerotic effects should be investigated.³⁶

The PU scaffold showed a good cell-seeding efficiency and provoked no higher, or even a lower, inflammatory cell reaction during the whole experiment. The endothelialization results were similar in the control group (group B). In summary, the PU scaffolds proved their good biocompatibility. Our conditioning bioreactor allowed the cells to adapt to shear stress by establishing a strong ECM. At this point, these results cannot yet be transferred to the *in vivo* environment; however, the results have suggested that the polymer-based scaffold is a good candidate for this step. Thus this new tissue engineered heart valve may offer a new option for aortic valve replacement surgery.

Acknowledgment

The authors thank the ITV-Denkendorf and especially Dr. -Ing. Martin Dauner for his support in manufacturing the synthetic scaffolds. Additionally, we thank Ulrike Haas and Antje Uhlrig for their help in the evaluation of the experiments.

References

1. Yacoub MH, Takkenberg JJ: Will heart valve tissue engineering change the world? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2: 60–61, 2005.
2. De Campos NL, de Andrade RR, Silva MA: Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 25: 457–465, 2010.
3. Hoffmann G, Lutter G, Cremer J: Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int* 105: 143–148, 2008.
4. Mendelson K, Schoen FJ: Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng* 34: 1799–1819, 2006.
5. Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920–926, 1993.
6. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, *et al*: Early *in vivo* experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 102(19 suppl 3): III22–III29, 2000.
7. Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Hilfiker A, Haverich A: Biological scaffolds for heart valve tissue engineering. *Methods Mol Med* 140: 309–317, 2007.
8. Gulbins H, Dauner M, Petzold R, *et al*: Development of an artificial vessel lined with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 128: 372–377, 2004.
9. Gulbins H, Pritisanac A, Uhlrig A, *et al*: Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini-roots: development of a seeding device and procedure. *Ann Thorac Surg* 79: 2119–2126, 2005.
10. Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, *et al*: Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 592–601, 2003.
11. Koenig F, Hollweck T, Pfeifer S: A pulsatile bioreactor for conditioning of tissue-engineered cardiovascular constructs under endoscopic visualization. *J Funct. Biomater.* 3, 480–496, 2012.
12. Yacoub MH, Cohn LH: Novel approaches to cardiac valve repair: From structure to function: Part I. *Circulation* 109: 942–950, 2004.
13. Butcher JT, Penrod AM, Garcia AJ, Nerem RM: Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1429–1434, 2004.
14. Schaefermeier PK, Cabeza N, Besser JC, *et al*: Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells. *ASAIO J* 55: 86–92, 2009.
15. Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, *et al*: Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg* 49: 221–225, 2001.
16. Schmidt D, Hoerstrup SP: Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly* 136: 618–623, 2006.
17. Zdrahala RJ, Zdrahala IJ: Biomedical applications of polyurethanes: A review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 14: 67–90, 1999.
18. Szycher M: Biostability of polyurethane elastomers: A critical review. *J Biomater Appl* 3: 297–402, 1988.
19. Kim MS, Kim JH, Min BH: Polymeric scaffolds for regenerative medicine. *Polymer Reviews* 51: 23–52, 2011.
20. Weston MW, LaBorde DV, Yoganathan AP: Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet. *Ann Biomed Eng* 27: 572–579, 1999.
21. Balachandran K, Sucusky P, Yoganathan AP: Hemodynamics and mechanobiology of aortic valve inflammation and calcification. *Int J Inflamm* 2011: 263870, 2011.
22. da Costa FD, Costa AC, Prestes R, *et al*: The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *Ann Thorac Surg* 90: 1854–1860, 2010.

23. Baraki H, Tudorache I, Braun M, et al: Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials* 30: 6240–6246, 2009.
24. Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, et al: *In vivo* functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur J Cardiothorac Surg* 38: 539–546, 2010.
25. Delmo Walter EM, de By TMMH, Meyer R, Hetzer R: The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin. *HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia* 4: 97–108, 2012.
26. Filová E, Straka F, Mirejovský T, Masín J, Bacáková L: Tissue-engineered heart valves. *Physiol Res* 58 suppl 2: S141–S158, 2009.
27. Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL: Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106: 912–917, 1993.
28. Van Snick J: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: 253–278, 1990.
29. Mukaida N, Harada A, Matsushima K: Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 9–23, 1998.
30. Simionescu A, Schulte JB, Fercana G, Simionescu DT: Inflammation in cardiovascular tissue engineering: the challenge to a promise: a minireview. *Int J Inflamm* 2011: 958247, 2011.
31. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170: 3369–3376, 2003.
32. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al: Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 278: 8508–8515, 2003.
33. Bosman FT, Stamenkovic I: Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200: 423–428, 2003.
34. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Schnell A, Turina M: Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for *in vitro* improvement of mechanical tissue properties. *ASAIO J* 48: 8–11, 2002.
35. Sierad LN, Simionescu A, Albers C, et al: Design and testing of a pulsatile conditioning system for dynamic endothelialization of polyphenol-stabilized tissue engineered heart valves. *Cardiovasc Eng Technol* 1: 138–153, 2010.
36. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S: New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation* 108: 1917–1923, 2002.

Low-flow Conditioning of Decellularized and Re-seeded Homografts in a Novel Pulsatile Bioreactor

Nicole Haller^{1,2}, Trixi Hollweck¹, Fabian König^{1,2}, Nikolaus Thierfelder², Erich Wintermantel², Christian Hagl¹, Bassil Akra^{*}

¹Department of Cardiac Surgery, Medical Center Munich University
Marchioninistraße 15, 81377 Munich, Germany

²Chair of Medical Engineering, Technical University Munich
Boltzmannstrasse 15, 85748 Garching, Germany

nicole.haller@mytum.de; trixi.hollweck@med.uni-muenchen.de; fabian.koenig@med.uni-muenchen.de
niki.thierfelder@gmail.com; wintermantel@tum.de; christian.hagl@med.uni-muenchen.de;

*bassil.akra@med.uni-muenchen.de

Abstract

Cardiovascular tissue engineering has emerged as a promising approach to overcome limitations of conventional heart valve substitutes regarding lack of growth, repair, and remodeling capability by mimicking a native heart valve. The present study has demonstrated that long-term conditioning of decellularized and re-seeded aortic homografts in a low-flow pulsatile bioreactor results in an improved quality of tissue engineering constructs. Cryopreserved and thawed homografts were decellularized by a detergent mixture. Decellularized homografts were primarily seeded with fibroblasts (FB) followed by colonization with endothelial cells (EC), both isolated from human saphenous vein segments. Re-seeded homografts were exposed to low-flow conditions (750 – 1 100 mL/min) for a time period of 12 d. Topographical examination was performed by scanning electron microscopy (SEM). Cell layer thickness, composition of extracellular matrix (ECM) and inflammatory response was investigated by immunohistochemistry (IHC). SEM analysis of re-seeded homografts showed a confluent and intact cellular coverage before and after conditioning. IHC demonstrated a distinct thickening of cellular layer. Cell specific staining demonstrated a confluent EC lining with a multilayer of FB underneath. The expression of ECM components, cytoskeletal and gap junctional proteins increased by conditioning. Inflammatory proteins were expressed in a low level. The novel pulsatile bioreactor provides a strong tool for conditioning of re-seeded decellularized homografts. Moreover, conditioning results in an increased quality of ECM in regard to connectivity, stability and cell communication, creating native-like heart valve prostheses.

Keywords

Conditioning; Pulsatile Bioreactor; Aortic Homograft; Low-Flow; Long-Term; Re-Seeding; Decellularization

Introduction

Heart-valve replacement is one of the most common surgical interventions for the therapy of end-stage valvular diseases (Capewell, Ford et al. 2010). Currently, two types of heart valve substitutes are commercially available: mechanical heart valves and bioprosthetic heart valves like bovine or porcine xenografts, as well as human-derived allografts (Sacks, Schoen et al. 2009). Both types of implants offer the possibility to recover the function of the heart valve, however, with several limitations affecting recipients' life quality. Mechanical heart valves exhibit a redundant noise derivation and necessitate a lifelong anticoagulation therapy to control thromboembolism (Campos, Andrade et al. 2010). Animal-derived biological heart valves tend to dystrophic calcification and primary degradation of tissue resulting in a loss of function (Vesely 2005). An alternative to animal-derived xenografts are human allografts. This type of prostheses offers the most suitable substitute by providing a multitude of benefits: homografts exhibit an excellent physiologic flow profile, a low incidence of thromboembolic complications without the need for a long-term anticoagulation therapy, and a high resistance to infections (Cebotari, Mertsching, et al. 2002). However, homografts are limited in availability due to a donor shortage. Another problem of human-derived prostheses is the occurrence of endocarditis as the most common late complication, necessitating reoperations or in worst case resulting in the death of patients (Gott, Gillinov, et al. 1995). Moreover, the risk of long-term immunological reactions against the

foreign tissue of donator remains (Fischlein, Schutz, et al. 1995).

Tissue engineering (TE) has emerged as a rapidly expanding approach to address above-mentioned limitations of conventional substitutes by generating bioartificial substitutes *in vitro*. Hereby a widely accepted guideline is predicted by cell seeding of scaffold matrices which are subsequently conditioned in a bioreactor (Mendelson and Schoen 2006). In heart valve TE, a multitude of different approaches is described in literature concerning scaffold selection, cell source and bioreactor systems. Currently, there are several synthetic materials which can be degradable or non-degradable, natural polymers like collagen and fibrin, as well as decellularized tissues like biological porcine-derived scaffolds under investigation (Fuchs, Nasser, et al. 2001). Synthetic degradable polymers serve as a temporary matrix, which is often accompanied by immunological reactions (Mendelson and Schoen 2006). However, non-degradable polymers, feature poor cell retention (Taylor and Penhallow 1986). Cell sources comprise bone marrow derived mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells like endothelial progenitor cells (EPC) or autologous cells like fibroblasts (FB) and endothelial cells (EC) (Flanagan and Pandit 2003). However, methods for stem cell differentiation have not been clearly approved yet (Breitbach, Bostani et al. 2007). EPC are controversy discussed due to their origin and an exact identification concerning their rare number circulating in blood (Urbich and Dimmeler 2004). In contrast, differentiated cells from vena saphena magna are described as an appropriate cell population for TE applications (Schaefermeier, Cabeza, et al. 2009). The development of bioreactors for tissue formation under diverse mechanical forces reaches from pulsatile and radial stress up to translational and rotational straining (Chen and Hu 2006; Mironov, Kasyanov, et al. 2006). In this context, dynamic conditioning of tissue engineered heart valves predominates the static one, resulting in an improved collagen formation (Barron, Lyons, et al. 2003). Especially perfusion under pulsatile low-flow conditions promotes cell proliferation and ECM formation, which are responsible for mechanical stability, connectivity and remodeling capability of tissue (Lichtenberg, Cebotari, et al. 2006). This study aims to evaluate the effect of long-term conditioning of decellularized and re-seeded homografts in a self-made pulsatile bioreactor.

Material and Methods

Cell Cultivation

1) Cell Isolation

EC and FB were isolated from human saphenous vein segments, left over from bypass operations with informed consent from patients. Veins were stored in M199 media (Biochrom AG, Berlin, Germany) at 4°C for a maximum of 5 d until cell isolation. Segments were cannulized and washed with M199 containing 0.2% heparin (5000 I.E., Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 0.5% gentamicin (10 mg/mL, Biochrom AG, Berlin, Germany). For EC isolation, veins were filled with 1 mg/mL collagenase II (280 u, Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA) and were incubated for 30 min at 37°C/5% CO₂. For FB isolation, veins were incubated with 2 mg/mL collagenase II for 40 min at same conditions. Obtained cell solutions were rinsed out, centrifuged for 7 min at 500 rpm and were cultivated in appropriate growth media (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 0.2% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and 6% fetal calf serum (FCS, Lonza AG, Verviers, Belgium) for EC and 11% FCS for FB in culture flasks (12.5 cm², Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) at 37°C/5% CO₂. Medium was changed every 2 - 3 days. Cells were passaged at confluency.

2) Phenotypic Cell Verification

Phenotypic determination of FB and EC was performed by morphological classification using phase contrast microscopy (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany). FB were recognized by their elongated spindle-like appearance (Mauch 1988). EC were identified by their typical cobblestone morphology (Kubota 1988). Additionally, the cell types were verified by immunocytochemistry. Cells were seeded and cultured on culture slides (eight-chamber; BD Biosciences, Bedford, USA). At confluency cells were fixed and stored in 96% ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at -80°C for a minimum of 48 h. Slides were washed three times with PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany) and endogenous peroxidase activity was subsequently blocked via treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Primary antibody for CD31 (EC; 0.14 µg/mL, Dianova GmbH, Hamburg, Germany) and TE-7 (FB; 0.67 µg/mL, Millipore Corporation, BioScience Division,

Temecula, CA, USA), were applied respectively and the slides were incubated for 30 min. After washing, slides were covered with biotinylated link (HRP Detection System, Biozol GmbH, Eching, Germany) according to manufacturer's protocol and were incubated for 10 min. Cells were labelled with HRP streptavidin for 10 min and were subsequently incubated with AEC-peroxidase substrate (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) for another 10 min. All steps were performed at room temperature (RT). Cell nuclei were stained with hemalaun (1:4 in PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A bright field microscope (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany) was used for qualitative evaluation.

Homograft Processing

1) Thawing

Cryopreserved aortic homografts (n = 6; h = 50 mm, d = 19 mm) were thawed in pre-warmed PBS at 56°C, cryoprotectiva were subsequently removed by washing once with PBS and once with M199 at 56°C.

2) Fixation

Aortic wall of heart valves were sutured (Supolene® suture, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Germany) to the base ring of special Teflon™ fixation unit (manufactured in house). The units consist of two circular plates (outer diameter $d_o = 5.0$ cm, inner diameter $d_i = 2.0$ cm) connected by four struts (h = 5.0 cm, d = 0.6 cm). Additionally inserts (h = 1.0 or 2.0 cm, d = 4.0 cm) variable in height were used for compensation of homografts' length restriction due to sampling.

3) Decellularization

After the storage in M199 for 24 h at 4°C, homografts were decellularized in a detergent mixture of PBS supplemented with 0.5% sodium dodecyl sulfate and 0.5% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at RT for 24 h. Decellularized homografts were washed six times for 24 h with PBS at RT under agitation to remove toxic residue.

4) Seeding

Decellularized homografts were seeded as previously described (Gulbins, Goldmund et al. 2003). Briefly, scaffolds were first seeded with FB, followed by colonization with EC. For both cell types a seeding density of $1.5 \cdot 10^6$ cells/cm² was

used. To ensure a uniform cell distribution, the seeding procedure was performed in a special rotating seeding device (running phase: 2.5 min, holding phase: 30 min) for 24 h at 37°C/5% CO₂. After FB seeding, the seeded heart valves were cultivated for 7 d at 37°C/5% CO₂ under static conditions. Medium was exchanged every 2-3 days. After this cultivation period, FB-seeded heart valves were analogously seeded with EC.

5) Conditioning

Re-seeded homografts (n = 6) were conditioned in a novel pulsatile bioreactor with an endoscopic monitoring unit (EU-Patent pending EP10166094; manufactured in-house (König, Hollweck, et al. 2012)) for 9 d at 750 mL/min and 3 d at 1100 mL/min medium flow, using EC growth medium supplemented with 6% FCS and 0.2% penicillin/streptomycin. Cell medium was partially changed every two days.

For further analysis, sampling was performed from native, decellularized and re-seeded homografts before, as well as after conditioning. Samples after conditioning were taken from the supravalvular, valvular and subvalvular region of the aortic wall, as well as from the valvular leaflets.

Analytics

1) Scanning Electron Microscopy

In order to analyze surface topography of human heart valve scaffolds in native, decellularized, seeded and conditioned status, samples were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Specimens were fixed in an aliquot of 456 mL aqua bi-dist. (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., Germany), 0.75 mL 1 N hydrochloric acid (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 43.5 mL glutaraldehyde and 5.65 g sodium cocodylate trihydrate (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) at 4°C for 48 h at least. Afterwards, samples were dehydrated in an ascending ethanol series (30%, 50%, 70%, 95%) and subsequently in 100% acetone at RT. Specimens were dried at the critical point, sputtered with gold for 180 s at 10⁻⁵ mbar and analyzed using a scanning electron microscope (EVO® LS 10; Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

2) Immunohistochemistry

Analysis by immunohistochemistry (IHC) was

performed to determine the seeding efficiency and integrity of the cellular coverage before and after conditioning. Samples were stained against CD31 (0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Dianova GmbH, Hamburg, Germany) and VE-cadherin (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany) for detection of EC. TE-7 staining (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) was used for the visualization of FB. To exclude the presence of smooth muscle cells (SMC), staining against SMC-myosin (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; DakoCytomation, Hamburg, Germany) was performed. Moreover, staining against connexin 43 (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) was used for quantification of gap junctioning, collagen IV (5.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) and fibronectin (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) for observation of extracellular matrix formation, and alpha actin (0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; DakoCytomation, Hamburg Germany) for cytoskeletal visualization. Additionally staining against ICAM-1 (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Chemicon-Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) and VCAM-1 (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) was performed to render inflammatory response while processing. Native, decellularized, re-seeded and conditioned samples were fixed in 4% formaldehyde (Microcos GmbH, Garching, Germany) for a minimum of 10 d at 4°C. Fixed specimens were paraffin-embedded and sectioned at 10 μm using a microtome. Removal of paraffin was performed by a descending solvent series in xylene (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), 100%, 96%, 70% ethanol and subsequently in distilled water (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., Germany) and PBS. Cell membranes were permeabilized by 0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in PBS for 10 min at RT. Samples for staining against VE-cadherin, connexin 43, fibronectin and collagen IV were exposed to 10% protease (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) in distilled water for 10 min at RT. For demasking antigens, specimens were boiled for 15 min in different buffers: 0.1 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) buffer (pH 8.0, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was used for demasking TE-7, ICAM-1 and VCAM-1. For demasking of alpha actin, tris/EDTA buffer (pH 9.0; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was used.

Demasking of CD31, VE-cadherin and connexin 43 was performed by Target Retrieval solution (pH 6.0, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany). After a cooling period of 20 min, samples were washed twice with distilled water and PBS. Specimens were blocked for endogenous peroxidase with 0.4% H_2O_2 in PBS for 10 min and were incubated overnight with primary antibody at 4°C. After washing with PBS, samples were covered with biotinylated link for 10 min and HRP Streptavidin label for 10 min according to manufacturer's protocol for HRP-Detection Kit, followed by chromogen labelling for 10 min using AEC-peroxidase substrate kit. All incubation steps were performed at RT. Cell nuclei were stained with hemalaun (1:4 in PBS). Controls for non-specific binding of chromogen label were performed by excluding primary antibody. Stained samples were observed using bright field microscopy.

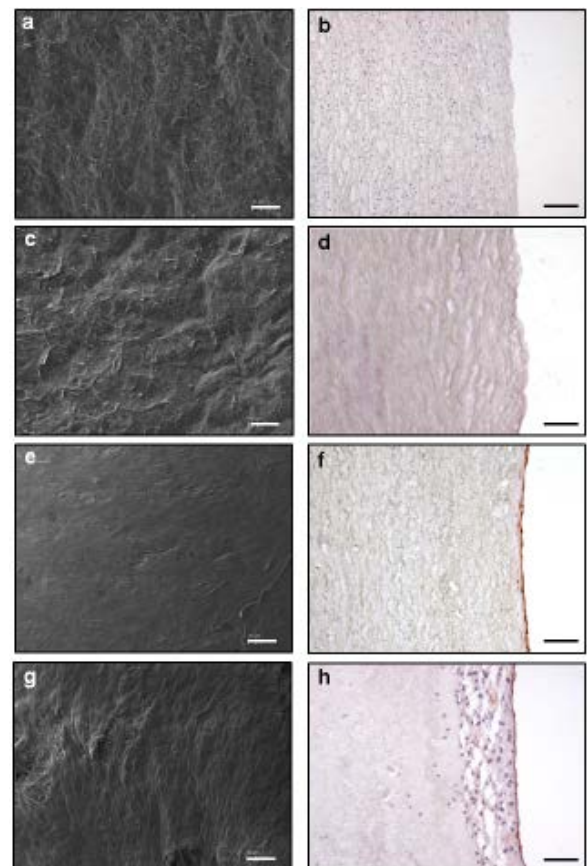


FIG. 1 CELLULAR COVERAGE IN DIFFERENT PROCESSING STATES. SCALE BARS: a, c, e, g = 30 μm , b, d, f, h = 100 μm

Results

Re-seeded Homografts Reveal a Confluent Cellular Coverage after Conditioning

Figure 1 demonstrates SEM (a - d) and IHC (e - h)

analysis of homografts inner surface in native (a, b), decellularized (c, d), re-seeded (e, f) and conditioned (g, h) state. The topographic alteration of surface is demonstrated by SEM analysis additional to selected images from IHC for lateral view. All pictures concern the inner aortic wall.

Native homografts showed an inhomogeneous and slightly rough surface without cells (a). Lateral view, however, revealed a multitude of cell nuclei in deeper tissue layers (b, purple). Decellularized samples demonstrated emerged randomly orientated fibers without cellular components resulting in a roughened surface (c, d). After re-seeding with FB and EC, specimens revealed a confluent and homogenous cellular coverage concealing scaffold fibres (e). Staining against CD31 also represented a confluent cell layer of EC on smoothed surface (f, red). Analysis of conditioned samples demonstrated the integrity of the cellular coating (g) with cell alignment in flow direction. Moreover, a distinct thickening of the cellular layer was observed. Besides an increase of cell number (cell nuclei, purple), formation of ECM was also enforced (h).

Cell Adherence on Conditioned Homografts Was Best at Leaflets

SEM analysis of supravalvular regions (Fig. 2a) of conditioned homografts showed a cell layer with only marginal fissure formation. Valvular (Fig. 2b) and subvalvular regions (Fig. 2c) of the aortic wall revealed a homogenous and confluent cellular layer without any damages. Leaflets (Fig. 2d), though to be the most stressed part of the heart valve, demonstrated the typical cobblestone morphology of EC indicating an intact complete cellular coverage.

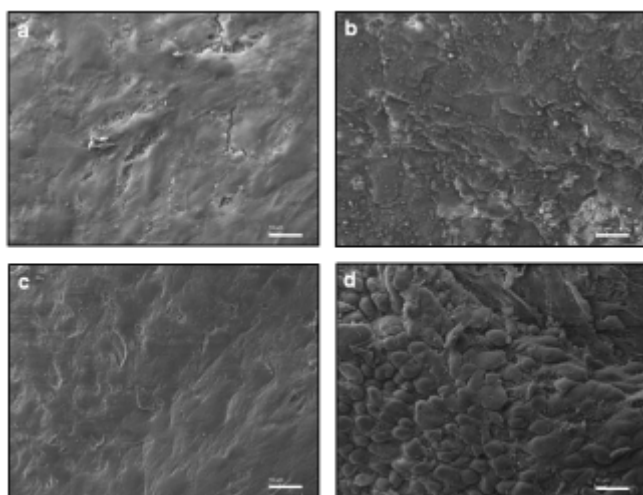


FIG. 2 TOPOGRAPHY OF DIFFERENT VALVULAR REGIONS
SCALE BARS: a - d= 30 μ m

Homografts were Endothelialized after Conditioning

Figure 3 demonstrated staining of homograft aortic wall against TE-7 (FB; a, b; brown) and CD31 (EC; c, d; brown) before (a, c) and after conditioning (b, d). Cell nuclei were stained with hemalaun (purple). Before conditioning, re-seeded specimens represented a FB monolayer (a, brown). In contrast, conditioned samples offered a bulky multilayer completely covering the scaffold (b, brown). CD31 staining revealed a color reaction on top of re-seeded homografts before (c, brown) and after conditioning (d, brown), indicating the presence of EC. Before conditioning the cell layer was rather thin and showed slight coloring of EC. Conditioned samples represented a thick cellular coverage and a well-established networking of cells. Color intensity and therefore protein expression, were also higher than those in non-conditioned specimens.

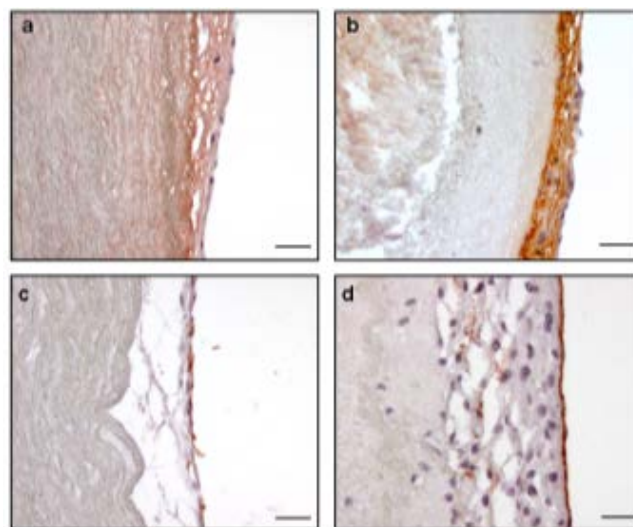


FIG. 3 MECHANICAL INTEGRITY OF THE CELLULAR
COVERAGE. SCALE BARS: a - d = 100 μ m

ECM Formation, Cell Connectivity and Communication Increased Through Conditioning

As demonstrated in Figure 4, collagen type IV, a main component of ECM was expressed less before conditioning (a). In contrast, after conditioning (b) a high expression of type IV collagen was detected accompanied by an enormous thickening of cell layer.

Non-conditioned cell layer represented marginal coloring after staining against fibronectin, indicating a low level of this ECM protein (c). The content of fibronectin increased after low-flow conditioning, represented by a brighter intense of reddening (d). In addition, the cellular coverage was thickened by conditioning treatment.

For the detection of an important protein of the

cytoskeleton, staining against alpha actin was performed. Results showed a high expression before (e) and after (f) conditioning.

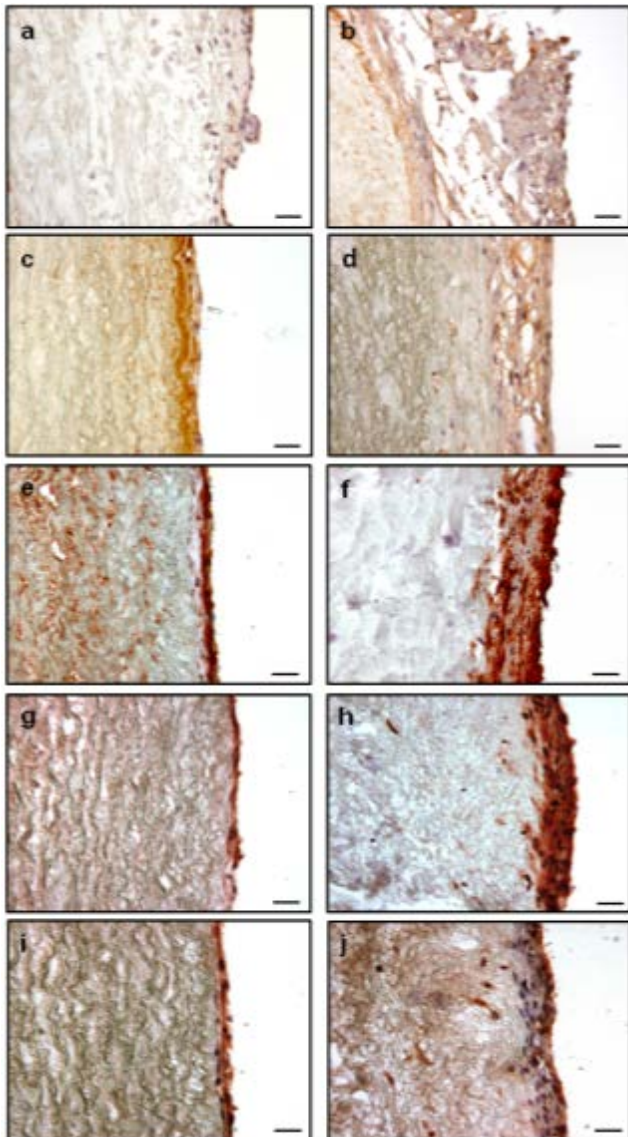


FIG. 4 ECM FORMATION AND CELLULAR CONNECTIVITY BEFORE AND AFTER CONDITIONING. SCALE BARS = 100 μm

While the thickness of the cell layer was rather spare, the gap junctional protein connexin 43 was already expressed before conditioning (g). After conditioning, a distinct thickening of cell layer was detected accompanied by a significant increase of connexin 43 expression (h). The reddening appeared throughout the cellular coverage indicating a high improvement in cell communication.

Samples before conditioning demonstrated a distinct staining efficiency proving VE-cadherin presence (i). The comparison of staining intense before and after conditioning represented a slight increase in brightness of reddening (j), hinting at numerical increase of EC.

Inflammatory Response Was Kept in a Low Level

For the evaluation of the stress level induced by mechanical strain on re-seeded homografts, staining against VCAM-1 and ICAM-1 was performed (Figure 5). EC continuously express ICAM-1, even before conditioning (a). After conditioning, a thickening of the cell layer with an increase of reddening was detected, indicating an increased stress level due to perfusion treatment (b). Specimens before conditioning reveal only a punctual VCAM-1-expression, indicating a low stress level (c). After conditioning a thickening of the cellular coverage was observed, however VCAM-1 was also expressed less after conditioning (d).

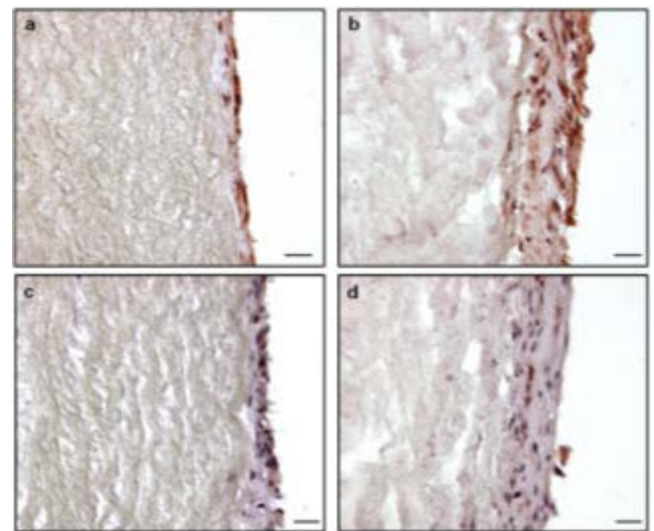


FIG. 5 INFLAMMATORY RESPONSE BEFORE AND AFTER CONDITIONING. SCALE BARS = 100 μm

Discussion

The herein proposed innovative method for processing decellularized homografts was demonstrated to be an efficient strategy to obtain a stable native-like cellular coating onto the grafts. TE, however, is a highly complex issue with a tremendous amount of regulation screws. Not only selection of the cell source, cell type, scaffold, or conditioning mode affects the artificial construct, also the fabrication, pre-treatment and storage of scaffold, seeding and cultivation technique and many more play important roles.

In our study, the selection of autologous cells for re-seeding of decellularized homografts was well considered. Schäfermeier *et al.* demonstrated, that cell source comparisons of different types showed excellent results for cells isolated from saphenous vein segments concerning viability and proliferation (Schäfermeier, Cabeza, et al. 2009). The benefits of using autologous EC and FB are versatile. On the one hand, it is possible to proceed with the recipient's own

cells that can be easily harvested from vein segments. Therefore, the risk of inflammatory reaction due to cell incompatibility after implantation is minimized. On the other hand, there is no necessity for differentiation performances including an extremely high effort in time and price. Even if there is the possibility and know how to differentiate stem cells into EC, the handling with autologous cells appears to be the more straightforward way of engineering.

Another improving fact, which predominates similar approaches, consists in the double re-seeding with FB and EC. Early examinations evidenced, that FB build an appropriate sublayer for EC settlement, which are used to form monolayers (Zund, Hoerstrup et al. 1998). The benefits of this method are manifold. On the one hand, entire and confluent cell coverage is ensured, as got obvious in SEM and IHC evaluation. On the other hand, the endothelial lining keeps non-thrombogenic interface (Frater, Gong, et al. 1992). Moreover, FB express a multitude of cytokines, chemokines and growth factors, which are responsible for ECM formation (Butcher, Simmons, et al. 2008). The importance of a stable ECM lies in the enhanced mechanical stability of cell layer, which was gratefully demonstrated by distinct color reaction in staining processes against fibronectin and collagen IV. Moreover, in our study not only a multiplication of tissue thickness on scaffold after conditioning was evidenced, but also cell connectivity was upgraded. Better cell-cell-communication, represented by an increased expression of gap junction proteins was detected by staining against connexin 43. Enhancement of cytoskeletal properties was proven by staining against alpha actin. The evidence of a low level of inflammatory factors throughout mechanical strain was provided by low staining efficiency against VCAM-1 and ICAM-1. In consent to these findings, also Sukosky *et al.* stated that pulsatile treatment of aortic tissue induces increased expression of these inflammatory factors (Sukosky, Balachandran, et al. 2009). Probably regulation of flow should be augmented slower or initial flow should be assessed at an easier rate for further reduction of immune response.

Also the selection of scaffold was well considered in planning this novel TE approach to gain best choice currently available. Currently, as described in various publications, several scaffold materials are under investigation for tissue engineering application. Among these scaffolds, allografts predominate in biomechanical and stability characteristics. Concerning the present

study's choice, the human derived allograft fulfills all desirable requirements, respectively. The homograft as scaffold offers three-dimensional environment, which is further roughened by decellularization. Also settlement and high grow ambition of cells were observed in SEM analysis.

As mentioned above, also decellularization influences the TE outcome. There are several studies about the ideal assay for complete decellularization featured by best preservation of scaffold construct. As stated by Schenke-Layland *et al.*, enzymatic decellularization is a time dependent process that is, however, accompanied by serious loss of mechanical stability of scaffold (Schenke-Layland, Vasilevski et al. 2003). A common-used alternative to enzymatic cell lysis, is the application of several detergents. Mostly considered are hypotonic or hypertonic tris buffers supplemented with Triton X-100, SDS and SD. Osmotic lysis containing Triton X-100 was associated with mainly preservation of ECM accompanied by unsatisfactory cell removal (Meyer, Chiu et al. 2006). Besides all other techniques for decellularization, the treatment with SDS and SD predominates in the matter of cell removal and has to be preferred at any rate instead of the enzymatic treatment (Tudorache, Cebotari et al. 2007). Functionality experiments with SDS-treated aortic valves showed complete leaflet competence under physiological pressures as well as physiological leaflet kinematics (Korossis, Booth et al. 2002). However, a structural alteration of tissue by SDS decellularization was confirmed by Kasimir *et al.* (Kasimir, Rieder et al. 2003). SDS treatment creates a visibly rough and highly porous surface as stated in this study by SEM analysis. Certainly, roughening of tissue fibers beneficially influenced seeding efficiency, resulting in complete cell coverage immediately after re-cellularization.

One of the most important impact factors on TE constructs, however, is the choice of bioreactor. Our group (König, Hollweck, et al. 2012) has developed previously a bioreactor that allows the creation of stable cellular constructs on different scaffold materials. The bioreactor provides a low pulsatile flow that grants the correct opening and closing of the valve without high shear stresses. The flow rate can be regulated allowing a steady and sensitive conditioning process. The compact, tubeless and modular design allows an accurate, simple and faultless assembly of the reactor in a laminar flow chamber resulting in minimized risk of contamination. Physiological conditions (37°C/5% CO₂) are provided by integrating

the bioreactor in a standard incubator. Sterile filters connected by luer-locks secure CO₂- exchange. Concerning conditioning of TE heart valves, there was an enormous raise in the number of investigations in the last few years. The variety of bioreactors disposing stretch or pressure strain, pulsatile or continuous flow, high or low flow rates is tremendous. All assemblies following the aim of enforcing ECM and creating a homogenous cell layer for better mechanical properties of scaffold. Mol *et al.* compared dynamic strain provided in a conditioning bioreactor with static culturing, proving an increased cell formation under dynamic conditions (Mol, Rutten *et al.* 2006). Besides other factors, particularly the intensity of loaded strain is important for successful TE. As Lichtenberg *et al.* reported a moderate pulsatile flow induces cell proliferation, whereas a high flow rate leads to significant damage of cellular layer and complete detachment of cells from cusps (Lichtenberg, Cebotari *et al.* 2006). In our study the gentle introduction to shear stress under low-flow conditions achieved great results. No severe damage of cell layer was observable in SEM analysis. Additionally, sectioned specimens for IHC represented all over confluent colonization. An enhanced proliferation was detected by heightened number of cell nuclei, visualized by hemalaun staining.

Conclusion

In this study, an innovative and successfully efficient strategy was demonstrated to obtain a stable native-like cellular coating onto the grafts. Low-flow conditioning supported ECM formation and the generation of a homogenous, confluent cell coverage. The novel pulsatile bioreactor provided a strong tool for conditioning of tissue engineered heart valves.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Antje Uhlig and Ulrike Haas for their support.

REFERENCES

- Barron, V., E. Lyons, C. Stenson-Cox, P. E. McHugh and A. Pandit. "Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review." *Ann Biomed Eng* 31 (2003): 1017-1030.
- Breitbach, M., T. Bostani, W. Roell, Y. Xia, O. Dewald, J. M. Nygren, *et al.* "Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts." *Blood* 110 (2007): 1362-1369.
- Butcher, J. T., C. A. Simmons and J. N. Warnock. "Mechanobiology of the aortic heart valve." *J Heart Valve Dis* 17 (2008): 62-73.
- Campos, N. L., R. R. Andrade and M. A. Silva. "Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years." *Rev Bras Cir Cardiovasc* 25 (2010): 457-465.
- Capewell, S., E. S. Ford, J. B. Croft, J. A. Critchley, K. J. Greenlund and D. R. Labarthe. "Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America." *Bull World Health Organ* 88 (2010): 120-130.
- Cebotari, S., H. Mertsching, K. Kallenbach, S. Kostin, O. Repin, A. Batrinac, *et al.* "Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix." *Circulation* 106 (2002): I63-I68.
- Chen, H. C. and Y. C. Hu. "Bioreactors for tissue engineering." *Biotechnol Lett* 28 (2006): 1415-1423.
- Fischlein, T., A. Schutz, M. Haushofer, R. Frey, A. Uhlig, C. Detter, *et al.* "Immunologic reaction and viability of cryopreserved homografts." *Ann Thorac Surg* 60 (1995): S122-125; discussion S125-126.
- Flanagan, T. C. and A. Pandit. "Living artificial heart valve alternatives: a review." *Eur Cell Mater* 6 (2003): 28-45; discussion 45.
- Frazer, R. W., G. Gong, D. Hoffman and K. Liao. "Endothelial covering of biological artificial heart valves." *Ann Thorac Surg* 53 (1992): 371-372.
- Fuchs, J. R., B. A. Nasser and J. P. Vacanti. "Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction." *Ann Thorac Surg* 72 (2001): 577-591.
- Gott, V. L., A. M. Gillinov, R. E. Pyeritz, D. E. Cameron, B. A. Reitz, P. S. Greene, *et al.* "Aortic root replacement. Risk factor analysis of a seventeen-year experience with 270 patients." *J Thorac Cardiovasc Surg* 109 (1995): 536-544; discussion 544-535.
- Gulbins, H., A. Goldmund, I. Anderson, U. Haas, A. Uhlig, B. Meiser, *et al.* "Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves." *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (2003): 592-601.
- Kasimir, M. T., E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel, *et al.* "Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves." *Int J Artif Organs* 26 (2003): 421-427.

- König, F., T. Hollweck, S. Pfeifer, B. Reichart, E. Wintermantel, C. Hagl, et al. "A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization." *Journal of Functional Biomaterials* 3 (2012): 480-496.
- Korossis, S. A., C. Booth, H. E. Wilcox, K. G. Watterson, J. N. Kearney, J. Fisher, et al. "Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves." *J Heart Valve Dis* 11 (2002): 463-471.
- Kubota, Y., H. K. Kleinman, G. R. Martin, T. J. Lawley. "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures." *JCB* 107 (1988): 1589-1598.
- Lichtenberg, A., S. Cebotari, I. Tudorache, G. Sturz, M. Winterhalter, A. Hilfiker, et al. "Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves." *J Heart Valve Dis* 15 (2006): 287-293; discussion 293-284.
- Mauch, C., Hatamochi A., Scharffetter K., Krieg T. "Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel" *Experimental Cell Research* 178 (1988): 493-503.
- Mendelson, K. and F. J. Schoen. "Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges." *Ann Biomed Eng* 34 (2006): 1799-1819.
- Meyer, S. R., B. Chiu, T. A. Churchill, L. Zhu, J. R. Lakey and D. B. Ross. "Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat." *J Biomed Mater Res A* 79 (2006): 254-262.
- Mironov, V., V. A. Kasyanov, M. J. Yost, R. Visconti, W. Twal, T. Trusk, et al. "Cardiovascular tissue engineering I. Perfusion bioreactors: a review." *J Long Term Eff Med Implants* 16 (2006): 111-130.
- Mol, A., M. C. Rutten, N. J. Driessen, C. V. Bouten, G. Zund, F. P. Baaijens, et al. "Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application." *Circulation* 114 (2006): 1152-1158.
- Sacks, M. S., F. J. Schoen and J. E. Mayer. "Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering." *Annu Rev Biomed Eng* 11 (2009): 289-313.
- Schaefermeier, P. K., N. Cabeza, J. C. Besser, P. Lohse, S. H. Daebritz, C. Schmitz, et al. "Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells." *ASAIO J* 55 (2009): 86-92.
- Schenke-Layland, K., O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K. J. Halhuber, et al. "Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves." *J Struct Biol* 143 (2003): 201-208.
- Sucosky, P., K. Balachandran, A. Elhammali, H. Jo and A. P. Yoganathan. "Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009): 254-260.
- Taylor, D. E. and J. E. Penhallow. "Comparative biotolerance of polyacrylamide-agarose gel, silicone rubber and microporous PTFE as soft tissue implants." *Biomaterials* 7 (1986): 277-282.
- Tudorache, I., S. Cebotari, G. Sturz, L. Kirsch, C. Hurschler, A. Hilfiker, et al. "Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves." *J Heart Valve Dis* 16 (2007): 567-573; discussion 574.
- Urbich, C. and S. Dimmeler. "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." *Circ Res* 95 (2004): 343-353.
- Vesely, I. "Heart valve tissue engineering." *Circ Res* 97 (2005): 743-755.
- Zund, G., S. P. Hoerstrup, A. Schoeberlein, M. Lachat, G. Uhlschmid, P. R. Vogt, et al. "Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh." *Eur J Cardiothorac Surg* 13 (1998): 160-164.

RESEARCH

Open Access

Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering

Genoveva Aleksieva^{1†}, Trixi Hollweck^{1†}, Nikolaus Thierfelder¹, Ulrike Haas¹, Fabian Koenig³, Cornelia Fano², Martin Dauner², Erich Wintermantel³, Bruno Reichart¹, Christoph Schmitz¹ and Bassil Akra^{1*}

* Correspondence: bassil.akra@med.uni-muenchen.de

[†]Equal contributors

¹Department of Cardiac Surgery, Medical Center Munich University, Marchioninistraße 15, Munich 81377, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Background: Tissue engineering represents a promising new method for treating heart valve diseases. The aim of this study was evaluate the importance of conditioning procedures of tissue engineered polyurethane heart valve prostheses by the comparison of static and dynamic cultivation methods.

Methods: Human vascular endothelial cells (ECs) and fibroblasts (FBs) were obtained from saphenous vein segments. Polyurethane scaffolds (n = 10) were primarily seeded with FBs and subsequently with ECs, followed by different cultivation methods of cell layers (A: static, B: dynamic). Group A was statically cultivated for 6 days. Group B was exposed to low flow conditions (t₁= 3 days at 750 ml/min, t₂= 2 days at 1100 ml/min) in a newly developed conditioning bioreactor. Samples were taken after static and dynamic cultivation and were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), immunohistochemistry (IHC), and real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: SEM results showed a high density of adherent cells on the surface valves from both groups. However, better cell distribution and cell behavior was detected in Group B. IHC staining against CD31 and TE-7 revealed a positive reaction in both groups. Higher expression of extracellular matrix (ICAM, Collagen IV) was observed in Group B. RT-PCR demonstrated a higher expression of inflammatory Cytokines in Group B.

Conclusion: While conventional cultivation method can be used for the development of tissue engineered heart valves. Better results can be obtained by performing a conditioning step that may improve the tolerance of cells to shear stress. The novel pulsatile bioreactor offers an adequate tool for in vitro improvement of mechanical properties of tissue engineered cardiovascular prostheses.

Keywords: Tissue engineering, Heart valve, Polyurethane scaffold, Static cultivation, Dynamic cultivation

Background

Valve replacement represents the most common surgical therapy for end staged valvular diseases with an estimated number of 275.000 procedures performed annually worldwide [1]. The commonly used artificial heart valves are mechanical or biological prostheses. According to the American Heart Association, mechanical heart valves are recommended for patient under 60 years of age [2]. However, the increased risk of postoperative hemorrhage, thromboembolism, and drug-drug interactions affect patients' quality of life

[2]. Biological valves are accompanied by a low risk for thromboembolism and endocarditis, and offer growth potential for pediatric patients [3,4]. However, biological valves are associated with different major complications such as deterioration of valve structure, graft calcification, limited durability, and affinity to immunological response [2]. Tissue engineered heart valves (TEHVs) are a promising approach to overcome the limitations of conventional heart valve prostheses. Tissue engineering generally aims for the *in-vitro* creation of viable neo-tissue indistinguishable from native tissue [5]. Biological and engineering challenges are focused on three principal components that comprise the “cell–scaffold–bioreactor system” [6]. An adequate combination of these components could be the ideal solution for heart valve grafting leading to biocompatibility, non-thrombogenicity, non-teratogenicity, long-term durability and growth potential of TEHVs [7]. The aim of this study was to compare static cultivation (SC) and dynamic cultivation (DC) of endothelial cells (ECs) and fibroblasts (FBs) seeded onto polyurethane heart valve scaffolds by evaluating cell confluency, extracellular matrix (ECM) formation and inflammatory response.

Methods

Cell isolation

Cells were isolated from human saphenous vein segments left over from cardiac surgery interventions. Tissue samples were only taken with the patients' informed consent and were further used in an anonymous fashion with no individual-related data. Veins were cannulated and rinsed with aliquots of 500 ml M199 (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 1 ml Heparin (5000 i.E.; Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 5 ml Gentamycin (10 mg/ml; Invitrogen AG, Darmstadt, Germany). For EC isolation, segments were incubated with trypsin/EDTA-solution (10x; Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany) for 25 min at 37°C / 5% CO₂. For FBs isolation, veins were subsequently flushed with 2 mg/ml collagenase type II (Worthington Biochemical Corporation / CellSystems GmbH, St. Katharinen, Germany) in human serum albumin (200 g/l; Baxter GmbH, Unterschleißheim, Germany) and incubated for 30 min. Cell suspensions were centrifuged at 750 rpm for 10 min, and cultured in endothelial cell growth medium (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 6% FCS (Lonza GmbH, Köln, Germany) and 0.2% Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) and fibroblast growth medium (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 11% FCS and 0.2% Penicillin/Streptomycin, respectively. Medium was changed every second day. Cells were passaged at confluency.

Phenotypic characterization of isolated cells

Morphological and immunocytological analysis were performed to characterize isolated cell types. ECs were identified by their typical cobblestone morphology. FBs were identified by a characteristic elongated spindle-shaped appearance with several extensions. For immunocytological verification of ECs and FBs, 35.000 cells/cm² were cultured in an 8-well culture slide (BD Bioscience, Bedford, USA) until confluency. Vascular cells were stained against EC-specific CD31 (0.14 µg/ml; Dianova GmbH, Hamburg, Germany) and FB-specific TE-7 (0.67 µg/ml, Millipore Corporation BioScience Division, Temecula, CA, USA), respectively according to manufacturer's protocol using EnVision™ + Dual Link System-HRP (Dako

Deutschland GmbH, Hamburg, Germany). Briefly, cells were fixed at -80°C in 96% ethanol. The staining procedure was performed at room temperature (RT). After rinsing with phosphate buffered saline (PBS; Biochrom AG, Berlin, Germany) and blocking for endogenous peroxidase using 30% H_2O_2 , cells were incubated with the primary antibody for 30 min. The procedure was completed by incubation with EnVision™ + Dual Link System- HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) for 30 min; and AEC- Peroxidase-Substrate (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) incubation for 10 min. Counterstaining was performed using 25% Mayer's Haemalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in PBS for 3 min at RT. Controls for non-specific binding of biotinylated link were performed by excluding the primary antibody. The stained cells were analyzed using bright field microscopy (Leica DMR microscope, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Fabrication of polyurethane heart valve prosthesis (PHVP)

PHVPs (h = 55 mm, d = 18 mm) were manufactured by ITV-Denkendorf (Denkendorf, Germany) using a polyurethane spraying technique (patent DE 28 06 030 C2). Randomly oriented PU fibres formed a sheet with a thickness of 0.3 mm. For seeding purpose, PHVP was γ -sterilized at 10 kGy according to a certified sterilization procedure.

Seeding procedure

PHVPs were sutured to a Teflon® fixation unit (Figure 1a, manufactured in-house) and were seeded as previously described [8]. Briefly, PHVPs were initially seeded with FBs (1.5×10^6 cells/cm²) using a 3D- rotating seeding device (Figure 1b; manufactured in-house) for 24 h (running phase: 2.5 min; holding phase: 30 min), at $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ followed by a stationary cultivation phase of 6 d (SC group) and 1 d (DC group), respectively at $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ in a glass container (Figure 1c). Cell medium was changed every two days. Colonization of ECs was analogously performed.

Cultivation procedures

For SC, seeded PHVPs (n = 5) were cultured for 6 d at $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ in a glass container. This procedure is analog the stationary cultivation phase of the seeding procedure shown in Figure 1c.

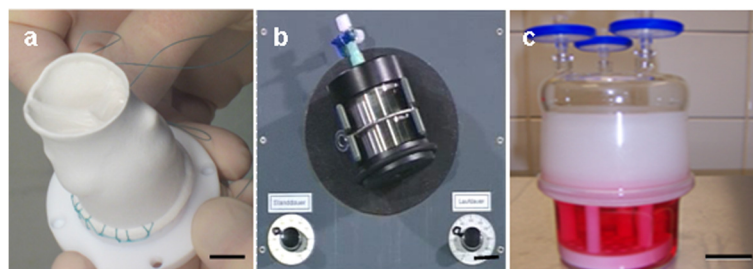


Figure 1 Seeding of PHVPs. PHVPs were sutured to a Teflon® fixation unit (a) and were consecutively seeded with FBs and ECs using a 3D-rotating bioreactor (b) for 24 h at $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$. After the dynamic seeding procedure, PHVPs were statically cultivated for 6 d (SC group) and 1 d (DC group), respectively at $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ in a glass container (c). Scale bars: a = 10 mm, b = 20 mm, c = 40 mm.

For DC, PHVPs ($n = 5$) were conditioned in a novel pulsatile bioreactor with an endoscopic monitoring unit (Figure 2; EU-Patent pending EP10166094; manufactured in-house, [9]) for 3 d at 750 ml/min and 2 d at 1100 ml/min medium flow, after FB seeding and after EC seeding. For the conditioning of FB seeded PHVP, fibroblast growth medium supplemented with 11% FCS and 0.2% Penicillin/Streptomycin were used. FB +EC seeded PHVP were conditioned using endothelial cell growth supplemented with 6% FCS and 0.2% Penicillin/Streptomycin. The viscosity of the media was $0.738 \text{ mPas} \pm 0.078 \text{ mPas}$. Cell medium was partially changed every two days. For further analysis, samples were taken from native as well as from seeded PHVPs after SC and after DC. Samples were taken from the supra-avalvular, valvular and subvalvular region of the aortic wall as well as from the valvular leaflets.

Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical stainings were performed to differentiate between FB and EC layers on seeded PHVPs ($n = 10$). Samples were fixed in 4% formalin (Microcos GmbH, Garching, Germany) for 10 d, embedded in paraffin and sectioned at $10 \mu\text{m}$. Specimens were deparaffinized in Xylene (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), rehydrated by a descending ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) series and permeabilized with 0.5% Triton-X (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in PBS for 10 min at RT. Samples for staining against VE-Cadherin, Connexin-43, Fibronectin and Collagen IV were exposed to 10% Protease (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) in distilled water (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., Germany) for 10 min at RT. For proteolysis of Fibronectin, Collagen IV, and SMC-Myosin, specimens were boiled in 0.1 mM EDTA buffer ($\text{pH} = 8.0$, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) or in Target Retrieval solution ($\text{pH} = 6.0$, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) for 15 min. For demasking of α -Actin, samples were boiled in 10 mM Tris/1 mM EDTA solution ($\text{pH} = 9.0$, Sigma Aldrich Chemie

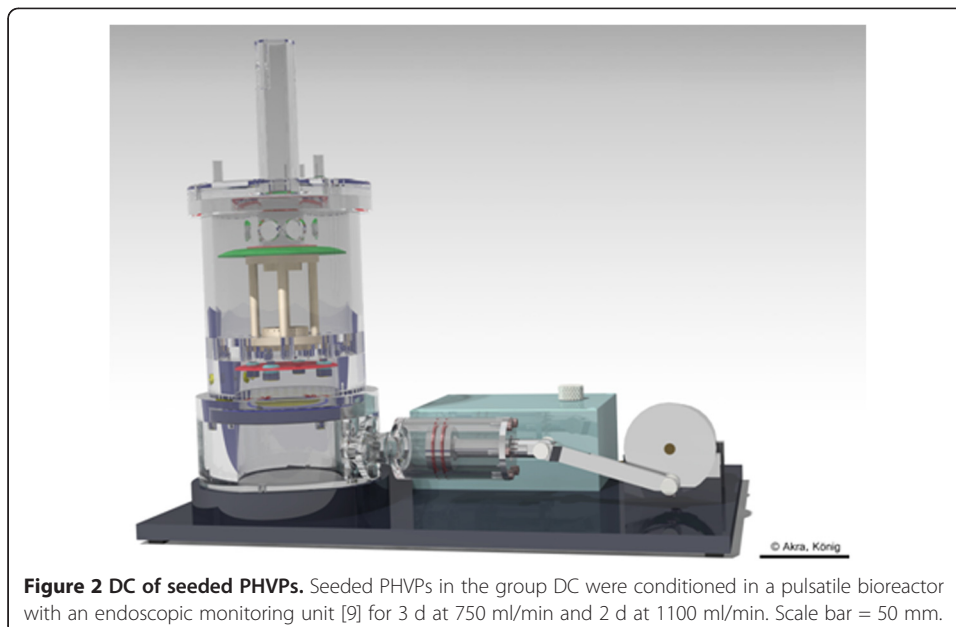


Figure 2 DC of seeded PHVPs. Seeded PHVPs in the group DC were conditioned in a pulsatile bioreactor with an endoscopic monitoring unit [9] for 3 d at 750 ml/min and 2 d at 1100 ml/min. Scale bar = 50 mm.

GmbH, Taufkirchen, Germany) for 15 min. After blocking for endogenous peroxidase using 0.4% H₂O₂ in PBS, samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against VCAM (200 µg/ml), ICAM, SMC-Myosin (0.954 mg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany), Fibronectin (0.6 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), TE-7 (0.1 mg/ml; Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Germany), Connexin-43 (1 µg/ml; Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Germany), VE-Cadherin (0.2 mg/ml; Beckmann Coulter Inc., Marseille, France), Collagen IV (5.4 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), CD31 (0.2 mg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and α -Actin (44 µg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany). Specimens were incubated with EnVision™ + Dual Link System-HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany), for 10 min, followed by AEC labelling using AEC-Peroxidase-Substrate Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) for 10 min at RT. Counterstaining was performed for 3 min at RT using Mayer's Hemalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Controls for non-specific binding of biotinylated link were performed by excluding primary antibodies. Sections in duplicates of each region were qualitatively observed using bright field microscopy (Leica DMR microscope, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) in four fields of vision. The intensity of IHC staining was analyzed by a minimum of two experts without being blinded to intervention and were classified as high (+++), medium (++), low (+) and absent (0).

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were fixed in 456 ml aqua bidest supplemented with 0.75 ml 1 N hydrochloric acid (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 43.5 ml glutaraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and 5.65 g sodium cocodylate trihydrate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 4°C for 48 h. Dehydration of fixed specimens was performed by an ascending ethanol series (30%, 50%, 70%, 96%) and after which the samples were placed in 100% acetone (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). After sample drying at the critical point, specimens were coated with gold for 180 s at 10⁻⁵ and examined under a scanning electron microscope (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany). Unseeded PHVP specimen served as negative controls.

Real time PCR (RT-PCR)

For detection of cytokine expression after SC and DC, RT-PCR was performed according to manufacturer's protocols. Briefly, RNA was isolated from samples stored in liquid nitrogen using RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). RNA purity and quantity was photometrically (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) assessed. QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) was applied for reverse transcription. Rotor-Gene Q 2plex System (35 cycles; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) were used to determine IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM and GAPDH (QuantiTect Primer Assay, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) expression. A standard curve was generated to determine the primer-dilution. Negative controls without sample material were included for all PCR measurements. Resulting Ct-values were normalized to the housekeeping gene GAPDH. PCR-product specificity was verified by melt curve analysis and gel electrophoresis (FlashGel System, Lonza GmbH, Basel, Switzerland).

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm standard deviation. Student's t-test was performed for comparison of data of unpaired samples. All tests are one-tailed; the probability value $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Cell confluence

Seeding and cultivation of PHVPs were performed as described in materials and methods section. SEM analysis (Figure 3) of native samples (a) showed randomly orientated fibres. FB seeded PHVPs revealed a rough confluent cellular coverage after SC (b) and a smoothed cellular surface after DC (c). FB and EC seeded PHVPs showed a confluent cell layer after SC (d) and DC (e). In addition, the typical cobblestone morphology indicates an endothelial layer after SC and DC. Moreover, flow conditions ($t_1 = 3$ d at 750 ml/min, $t_2 = 2$ d at 1100 ml/min) influence cell alignment; ECs of the internal side of the PHVPs were orientated in flow direction (e).

Protein expression

IHC examination was performed to compare cellular coverage and ECM formation after SC and DC. Cell nuclei were stained with haemalaun (purple). As shown in Figure 4, staining against CD31 (brown; arrows) revealed a positive reaction at both culture conditions (a: SC, b: DC), indicating EC presence. Fibroblasts were detected after SC (c) and DC (d) in a continuous multilayer by staining against TE-7 (brown, arrows). Comparison of cellular adhesion molecules demonstrated a lower expression of ICAM after SC (e; brown, arrows) than after DC (f; brown, arrows). VCAM was also expressed less after

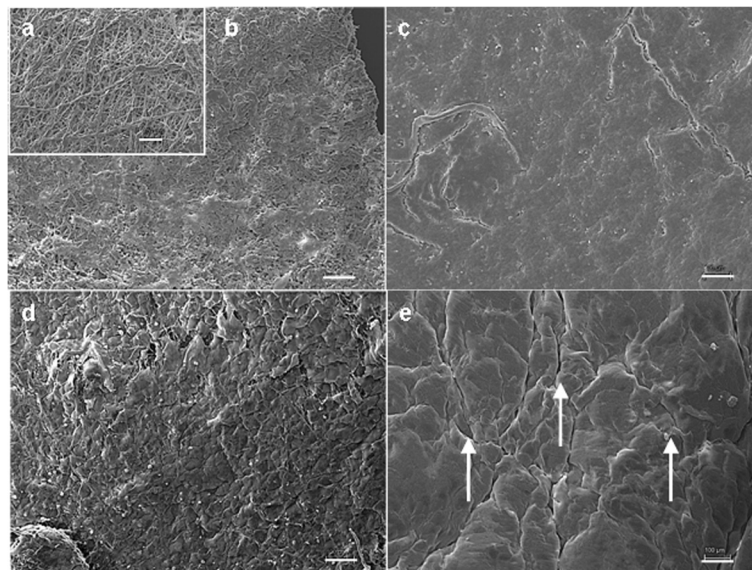


Figure 3 SEM analysis of PUHVs in different processing states. Native PHVPs demonstrate disordered fibers (a). FB seeded PHVPs revealed a rough confluent cellular coverage after SC (b) and a smoothed cellular surface after DC (c). FB and EC seeded PUHVs reveal a confluent cell layer with an EC-typical cobblestone morphology after SC (d). DC results in cell alignment following flow direction (e). These are representatives of ten independent experiments. Scale bars = 100 μ m.

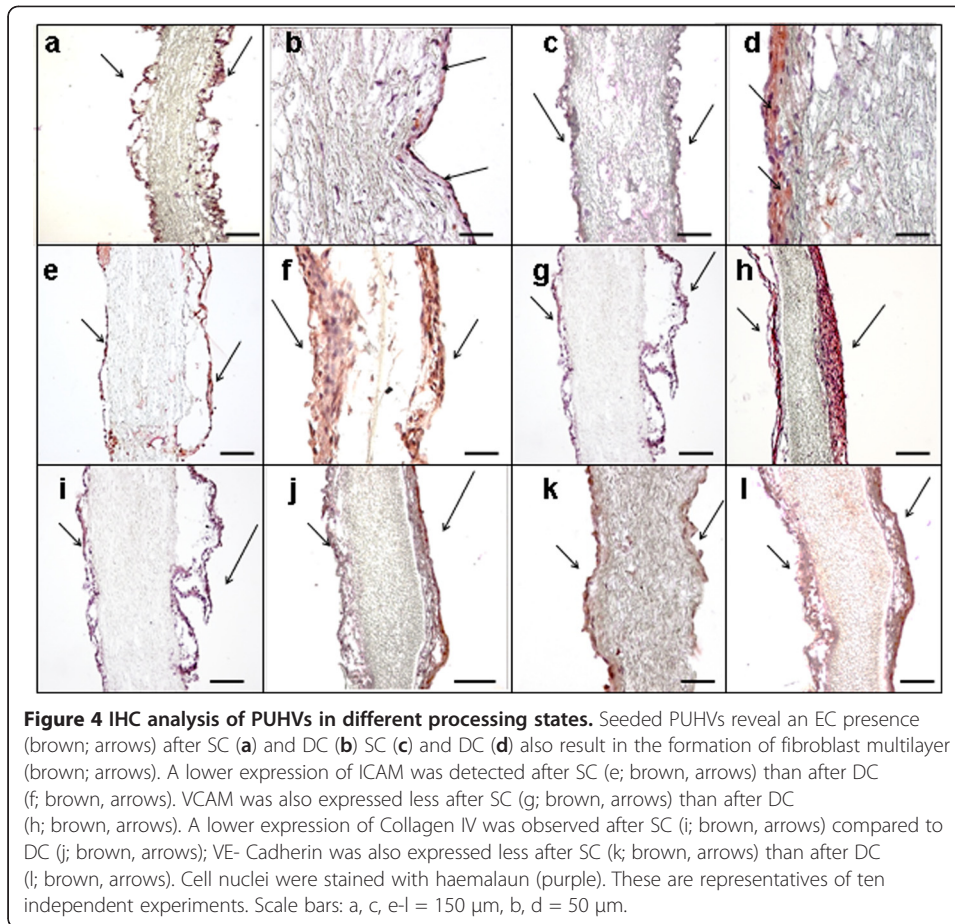
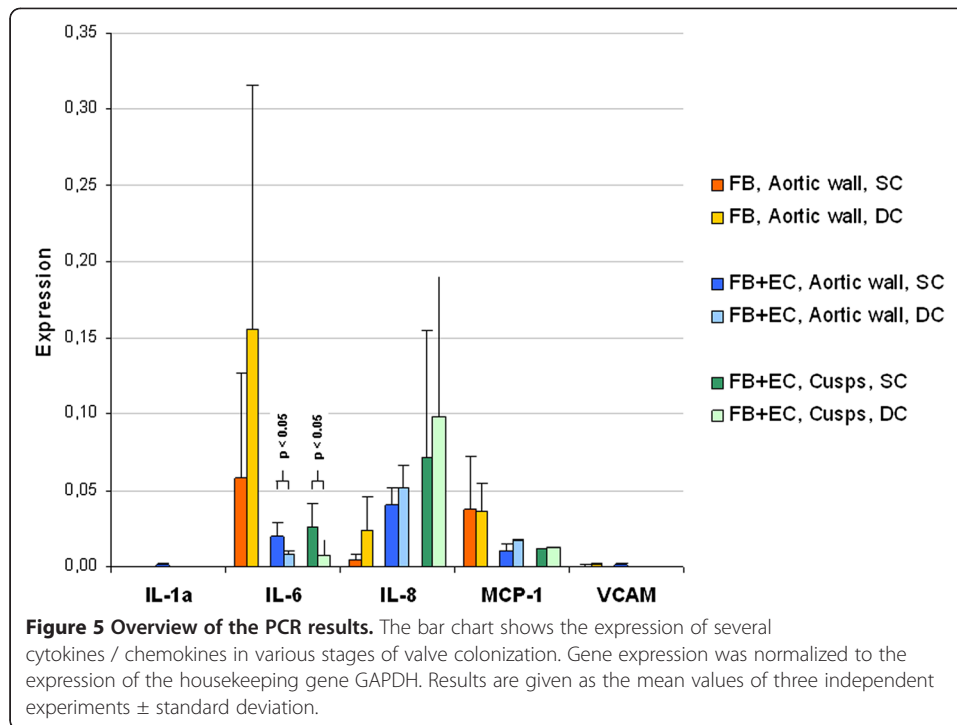


Figure 4 IHC analysis of PUHVs in different processing states. Seeded PUHVs reveal an EC presence (brown; arrows) after SC (a) and DC (b) SC (c) and DC (d) also result in the formation of fibroblast multilayer (brown; arrows). A lower expression of ICAM was detected after SC (e; brown, arrows) than after DC (f; brown, arrows). VCAM was also expressed less after SC (g; brown, arrows) than after DC (h; brown, arrows). A lower expression of Collagen IV was observed after SC (i; brown, arrows) compared to DC (j; brown, arrows); VE- Cadherin was also expressed less after SC (k; brown, arrows) than after DC (l; brown, arrows). Cell nuclei were stained with haemalaun (purple). These are representatives of ten independent experiments. Scale bars: a, c, e-l = 150 μ m, b, d = 50 μ m.

SC (g; brown, arrows) than after DC (h; brown, arrows). A lower expression of Collagen IV was observed after SC (i; brown, arrows) compared to DC (j; brown, arrows); VE- Cadherin was also expressed less after SC (k; brown, arrows) than after DC (l; brown, arrows). Controls for non-specific chromogen binding displayed negligible staining for antigens (data not shown).

Gene expression

Figure 5 illustrates the mean values of gene expression in the aortic wall and cusps after SC and DC. Gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The analysis of the aortic wall segments and the cusps of the heart valves proportionately showed equivalent gene expressions after SC and DC for all cytokines. The analysis of IL-1a and VCAM revealed a negligible expression after SC and DC. In both cultivation procedures seeding of EC results in a decrease of IL-6 (SC: -66%, DC: -95%) and MCP-1 (SC: -71%, DC: -56%) expression while IL-8 (SC: + 868%, DC: + 123%) was expressed to a higher level. The comparison of the SC and DC of FB+EC seeded aortic wall showed a lower expression of IL-6 (- 59%) and an increase of IL-8 (+ 29%) and MCP-1 (+ 51%) expression after DC. FB+EC seeded cusps showed a lower expression of IL-6 (- 72%), an increase of IL-8 (+ 37%) expression and a comparable MCP-1 expression (+ 10%) after DC compared to SC.



Discussion

Tissue engineering is an emerging field focused on the development of bioartificial substitutes to restore, maintain, or improve tissue function. These applications are the key for the future treatment of many diseases [10]. Currently, in tissue engineering are several scaffolds materials under investigation. Synthetic, non-degradable polymers like polyurethane are mainly characterized by their structural resistance, a three dimensional form with defined pore sizes, non-immunogenic and anti-thrombotic properties [11]. Within the monomeric unit, moieties could be substituted by different groups, resulting in versatile properties. Fabrication of hydrolytic stable PU already led to the development of different implants like vascular grafts, artificial heart valves and catheters [11,12]. Cells needed for the development of the tissue engineered heart valves can be obtained from a saphenous vein - vascular cells, be taken by a bone marrow biopsy - bone marrow stromal cells, from newborn patients, umbilical cord-derived cells or blood derived endothelial progenitor cells and chorionic villi-derived cells [13]. In our study, we obtained FBs and ECs from saphenous vein segments which were no longer required in coronary bypass operations. According to Schmidt et al., neither the proliferation in a monolayer nor the three-dimensional growth as tissue engineered constructs is influenced by the age of the cell donor [13], indicating that adult saphenous vein segments are an adequate cell source for tissue engineering applications. During the development of a cardiovascular tissue-engineered construct, a large challenge is the creation of a confluent and stable endothelial cell layer. Complications after the implantation of artificial grafts are caused in part by the lack of an intact endothelium [14]. The endothelial cell function has been described several times [15,16]. Consigny et al. showed a better adhesion and shear stress resistance of ECs on prosthetic vessels or heart valves pre-coated with different ECM proteins [16]. Although this coating improves cell adhesion, the integrity of the coating is compromised at high flow rates [17]. Another

strategy to enhance the adhesion of ECs is the pre-seeding of prosthesis with vascular FBs, mimicking conditions *in vivo* [8]. In addition, the fibrillar structure of PHVPs is similar to collagen, the main component of native ECM, and may support cell adhesion. Moreover, *In vivo*, cellular phenotype, morphology, and proliferation are affected by mechanical, electrical and chemical signals [18]. If these signals are inappropriate or absent, cells lose their ability to develop an ECM and to form organized tissues [19]. Thus, the simulation of physiological conditions, such as shear stress, plays an important role in the development of tissue engineered constructs [20,21]. For the fabrication of vascular grafts, Syedain *et al.* and Tschoeke *et al.* demonstrated the expression of ECM components by human dermal fibroblast and ovine arterial myofibroblasts in fibrin gel under dynamic culture conditions generated by a pulsed flow-stretch bioreactor and a pulsatile bioreactor, respectively [22,23].

In heart valve fabrication, bioreactors for tissue formation under dynamic culture conditions have been reported several times [24,25]. Ramaswamy *et al.* described a large collagen mass production after the use of simulated pulmonary artery conditions using an organ-level heart valve bioreactor [26]. The stimulation of human dermal fibroblasts seeded onto a decellularized porcine matrix by a pneumatic flow bioreactor, resulting in the synthesis of ECM proteins was shown by Zeltinger *et al.* [27]. Mol *et al.* demonstrated that dynamically strained leaflets reveal a more homogenous and denser cellular coverage than leaflets exposed to pre-strain only [25]. This is in line with results, generated in our study: SC and DC results in a confluent cell layer. In this context, numerous studies have reported the behaviour of ECs to flow shear stress *in-vitro*. ECs are constantly subjected to hemodynamic forces, including shear stresses that induce various functional changes in vascular endothelium. Initially, it was found that exposure of ECs to elevated shear stresses *in-vitro* caused them to align in the direction of flow [28]. In our study, after DC ECs were also orientated into flow direction after DC, indicating the adaptation to shear stress. The higher expression of cellular adhesion molecules after DC illustrates the intensified formation of cell connecting molecules, due to the pulsatile conditioning process. Moreover, a higher expression of Collagen IV, VE-Cadherin and Fibronectin was observed after DC indicating the formation of an ECM, essential for tissue and organ morphogenesis, maintenance, and reconstruction following injury in association with constructive tissue remodeling [29]. However, shear stress as a result of the DC provoked a higher cytokine expression compared to SC [30]. EC are able to sense changes in the shear stress or flow forces and respond, for instance, by expression of pro-inflammatory cytokines [31]. These cytokines and/or chemokines play key roles in mediating inflammatory reactions [32]. Gerszten *et al.* already concluded that cytokines are important modulators of monocyte-endothelial interactions under flow conditions [33]. McGill *et al.* demonstrated that consecutive seeding of heart valve scaffolds with FB and EC results in a less inflammatory response after DC than singly seeding with EC [34]. Chiu *et al.* reported that a coculture of vascular ECs with vascular smooth muscle cells induces the expression of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin genes in ECs in the static condition, whereas the application of shear stress to ECs inhibits these coculture-induced gene expressions [35]. Our analysis of IL-1a and VCAM expression revealed a negligible expression after SC and DC of FB and EC seeded scaffolds. These findings are also described by McHale *et al.* and Murui *et al.*, indicate a lower risk of inflammatory response and arteriosclerosis [36,37]. While IL-1a and VCAM were expressed to a lower level after DC, the expression of IL-8 increased after DC. Several studies have shown a correlation between IL-8 expression, arteriosclerosis and coagulation which is thought to

be caused by monocyte activation, adhesion and transmigration across the endothelial barrier [34,38]. However, not only shear stress, but rather cell isolation from biopsies provokes stress symptoms. For example, the process of human islet isolation triggers a cascade of stressful events in the islets of Langerhans involving the production of proinflammatory molecules. Two of the major pathways responsible for cellular responses to stress, already occurs in pancreatic cells during the isolation procedure. The production and release of IL-6, IL-8 and MCP-1, were observed days after the isolation procedure in isolated purified islets [39]. Therefore, the next step will be long-term conditioning of our TEHV's for a better adaption of cells to shear stress after isolation and cultivation procedure and consequently to reduce inflammatory response.

Conclusions

In conclusion, we demonstrate that DC is more effective than SC in generating TEHV's. DC supports ECM formation and homogeneity of the cellular coverage. The novel pulsatile bioreactor provides a strong tool for dynamic pre-conditioning of TEHV's.

Abbreviations

AEC: 3-amino-9-ethylcarbazole; CD31: Cluster of differentiation 31; DC: Dynamic cultivation; ECs: Endothelial cells; ECM: Extracellular matrix; FBs: Fibroblasts; FCS: Fetal calf serum; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HRP: Horseradish peroxidase; ICAM: Intracellular adhesion molecule; IHC: Immunohistochemistry; IL-1a: Interleukin-1a; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1; PBS: Phosphate buffered saline; PHVPs: Polyurethane heart valve prostheses; PU: Polyurethane; RNA: Ribonucleic acid; RT: Room temperature; RT-PCR: Real time polymerase chain reaction; SC: Static cultivation; SMC-Myosin: Smooth muscle cell myosin; TEHV's: Tissue engineered heart valves; VCAM: Vascular cell adhesion molecule.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GA mainly conducted experiments. TH wrote the manuscript, performed data analyses and statistical evaluations. NT also conducted experiments. UH supported the data generation. FK constructed the pulsatile bioreactor. CF manufactured the polymer scaffolds by spraying. MD was supervising the PHVP development and was one of the inventors of the 3-dimensional scaffolds. EW supervised the technical construction done by FK. BR was one of the inventors of the 3-dimensional scaffolds. CS supported this study from the medical point of view and supervised GA. BA conceived the experimental study, was the project owner; the device inventor, the group leader and overall supervisor. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Medtronic, Inc. for their support and ITV Denckendorf Produktservice GmbH for providing the polymers.

Author details

¹Department of Cardiac Surgery, Medical Center Munich University, Marchioninistraße 15, Munich 81377, Germany. ²Institute of Textile Technology and Process Engineering, Körschtalstraße 26, Denckendorf 73770, Germany. ³Chair of Medical Engineering, Technical University of Munich, Boltzmannstrasse 15, Garching 85748, Germany.

Received: 6 September 2012 Accepted: 30 November 2012

Published: 4 December 2012

References

1. Schoen FJ, Levy RJ: **Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention.** *Ann Thorac Surg* 2005, **79**:1072–1080.
2. Huang G, Rahimtoola SH: **Prosthetic heart valve.** *Circulation* 2011, **123**:2602–2605.
3. Sewell-Loftin MK, Chun YW, Khademhosseini A, Meryman WD: **EMT-inducing biomaterials for heart valve engineering: taking cues from developmental biology.** *J CardiovascTransl Res* 2011, **4**:658–671.
4. Cohen IS, Gaudette GR: *Regenerating the Heart.* New York: Springer; 2011.
5. Weber B, Emmert MY, Schoenauer R, Brokopp C, Baumgartner L, Hoerstrup SP: **Tissue engineering on matrix: future of autologous tissue replacement.** *Semin Immunopathol* 2011, **33**:307–315.
6. Meinel L, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, Kaplan D, Langer R, Vunjak-Novakovic G: **Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow.** *Ann Biomed Eng* 2004, **32**:112–122.
7. Cebotari S, Tudorache I, Schilling T, Haverich A: **Heart valve and myocardial tissue engineering.** *Herz* 2010, **35**:334–341.

8. Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlrig A, Meiser B, Reichart B: **Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, **125**:592–601.
9. König F, Hollweck T, Pfeifer S, Schmitz C, Reichart B, Wintermantel E, Akra B: **A pulsatile bioreactor for conditioning of tissue-engineered cardiovascular constructs under endoscopic visualization.** *J Funct Biomater* 2012, **3**:480–496.
10. Khait L, Hecker L, Blan NR, Cohan G, Migneco F, Huang YC, Birla RK: **Getting to the heart of tissue engineering.** *J Cardiovasc Transl Res* 2008, **1**:71–84.
11. Wintermantel E, Ha SW: *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag GmbH; 2008.
12. Wintermantel E, Ha SW: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag GmbH; 2002.
13. Schmidt D, Hoerstrup SP: **Tissue engineered heart valves based on human cells.** *Swiss Med Wkly* 2007, **3**:480–496.
14. Stachelek SJ, Alferiev I, Connolly JM, Sacks M, Hebbel RP, Bianco R, Levy RJ: **Cholesterol-modified polyurethane valve cusps demonstrate blood outgrowth endothelial cell adhesion post-seeding in vitro and in vivo.** *Ann Thorac Surg* 2006, **81**:47–55.
15. Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R, Hetzer R: **Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes.** *Int J Artif Organs* 2001, **24**:235–242.
16. Consigny PM, Vitali NJ: **Resistance of freshly adherent endothelial cells to detachment by shear stress is matrix and time dependent.** *J Vas Intery Radiol* 1998, **9**:479–485.
17. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM: **Current status of prosthetic bypass grafts: a review.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005, **74**:570–581.
18. Georges PC, Janmey PA: **Cell type-specific response to growth on soft materials.** *J Appl Physiol* 2005, **98**:1547–1553.
19. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A: **Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review.** *Ann Biomed Eng* 2003, **31**:1017–1030.
20. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA: **Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2005, **60**:24–34.
21. Sheikh S, Rainger GE, Gale Z, Rahman M, Nash GB: **Exposure to fluid shear stress modulates the ability of endothelial cells to recruit neutrophils in response to tumor necrosis factor-alpha: a basis for local variations in vascular sensitivity to inflammation.** *Blood* 2003, **102**:2828–2834.
22. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW, Lee A, Tranquillo RT: **Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring.** *Biomaterials* 2011, **32**:714–722.
23. Tschöke B, Flanagan TC, Cornelissen A, Koch S, Roehl A, Sriharwoko M, Sachweh JS, Gries T, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S: **Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft.** *Artif Organs* 2008, **32**:800–809.
24. Sierad LN, Simionescu A, Albers C, Chen J, Maivelett J, Tedder ME, Liao J, Simionescu DT: **Design and testing of a pulsatile conditioning system for dynamic endothelialization of polyphenol-stabilized tissue engineered heart valves.** *Cardiovasc Eng Technol* 2010, **1**:138–153.
25. Mol A, Driessen NJ, Rutten MC, Hoerstrup SP, Bouten CV, Baaijens FP: **Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach.** *Ann Biomed Eng* 2005, **33**:1778–1788.
26. Ramaswamy S, Gottlieb D, Engelmayr GC, Aikawa E, Schmidt DE, Gaitan-Leon DM, Sales VL, Mayer JE, Sacks MS: **The role of organ level conditioning on the promotion of engineered heart valve tissue development in vitro using mesenchymal stem cells.** *Biomaterials* 2010, **31**:1114–1125.
27. Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B: **Development and characterization of tissue-engineered aortic valves.** *Tissue Eng* 2011, **7**:9–22.
28. Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA: *The Heart*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2004.
29. Simionescu A, Schulte JB, Fercana G, Simionescu DT: **Inflammation in cardiovascular tissue engineering: the challenge to a promise: a minireview.** *Int J Inflam* 2011, **2011**:1–11.
30. Montes-Worboys A, Rodriguez-Portal JA, Arellano-Orden E, Digon-Pereiras J, Rodriguez-Panadero F: **Interleukin-8 activates coagulation and correlates with survival after talc pleurodesis.** *Eur Respir J* 2010, **35**:160–166.
31. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr: **Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells.** *J Clin Invest* 1994, **94**:885–891.
32. Feghali CA, Wright TM: **Cytokines in acute and chronic inflammation.** *Front Biosci* 1997, **2**:d12–d26.
33. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Lusinskas FW, Rosenzweig A: **MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.** *Nature* 1999, **398**:718–723.
34. McGill SN, Ahmed NA, Christou NV: **Endothelial cells: role in Infection and Inflammation.** *World J Surg* 1998, **22**:171–178.
35. Chiu JJ, Chen LJ, Lee PL, Lee CI, Lo LW, Usami S, Chien S: **Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells.** *Blood* 2003, **101**:2667–2674.
36. McHale JF, Marshall D, Haskard DO: **TNF- α and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice.** *J Immunol* 1999, **7**:3993–4000.
37. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: **Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells.** *J Clin Invest* 1993, **92**:1866–1874.
38. Rainwater DL, Shi Q, Mahaney MC, Hodara V, Vandenberg JL, Wang XL: **Genetic regulation of endothelial inflammatory responses in baboons.** *Arterioscler Thromb Vac Biol* 2010, **30**:1628–1633.
39. Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD: **Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment.** *Diabetes* 2004, **53**:2559–2568.

doi:10.1186/1475-925X-11-92

Cite this article as: Aleksieva et al.: Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering. *BioMedical Engineering OnLine* 2012 **11**:92.

Danksagung

Für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion gilt mein größter Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christoph Schmitz. Er stand mir während der gesamten Arbeit mit seinem hervorragenden akademischen Rat zur Seite. Sowohl bei der Durchführung der Versuche, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse und der Korrektur meiner Niederschrift konnte ich mich jederzeit auf seine Hilfe, seine konstruktiven Anregungen und seine Motivation verlassen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bruno Reichart gebührt ebenso wie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Christian Hagl großer Dank für die Möglichkeit, meine Promotion an ihrem Institut, der herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München ermöglicht zu haben.

Besonders hervorheben möchte ich die Betreuung von Herrn Dr. Bassil Akra. Er hat mich von der ersten Stunde bis zum letzten Satz dieser Arbeit begleitet, unterstützt und gefördert. Bei Problemen oder Nachfragen konnte ich ihn jederzeit, auch in seiner Freizeit, um Rat bitten. Herr Dr. Bassil Akra hat mich nicht nur umfangreich in sämtliche verwendete Methoden eingewiesen, sondern hat mich auch mit seinem enormen Wissen und technischen Verstand bei der Ausarbeitung und Umsetzung der Versuche unterstützt. Mit seiner konstruktiven Kritik spornte er mich immer wieder an, ermöglichte mir aber auch durch die Korrektur der Niederschrift dieser Arbeit, viel von ihm zu lernen. Er fand einerseits in schwierigen Momenten stets die richtigen Worte, hatte andererseits aber auch immer einen Witz auf den Lippen, so dass mir die Arbeit mit ihm stets sehr viel Freude bereitet hat. Ganz besonders freue ich mich, dass über die Jahre unserer Zusammenarbeit eine gute Freundschaft entstanden ist.

Für die Entwicklung und Herstellung des verwendeten Bioreaktors möchte ich mich auch bei Herrn Fabian König bedanken. Seine Ideen und die gelungene technische Umsetzung erleichterten mir meine Versuche maßgeblich.

Ein großer Dank gilt auch Frau Antje Uhlig, die mich unter anderem in den Umgang mit Homografts eingewiesen hat. Außerdem stand mir Frau Antje Uhlig immer bereitwillig mit ihrer enormen klinischen Erfahrung hilfreich zur Seite und wurde nie müde, meine

Fragen zu beantworten. Zusätzlich möchte ich mich bei ihr für die Überlassung einiger von ihr angefertigter Fotos zur Verwendung in dieser Arbeit bedanken.

Für die Hilfe in der Verarbeitung der unzähligen immunhistochemischen Proben will ich mich außerdem ausdrücklich bei unserer langjährigen Mitarbeiterin im Labor, Frau Ulrike Haas, bedanken. Sie konnte mir durch ihre große Erfahrung im Umgang mit Zellkulturen auch hier viele sehr hilfreiche Tipps geben und unterstützte mich bei Bedarf auch gerne tatkräftig.

Für die Verwendung von Geräten und Materialien, sowie die hilfreiche Unterstützung bei der Paraffineinbettung vieler Proben sei an dieser Stelle auch Frau Angelika Henn aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung am Klinikum der Universität München dankend erwähnt.

Ebenfalls gilt mein Dank der Laborwerkstatt des Klinikums. Die Mitarbeiter haben uns mit der Herstellung des verwendeten Bioreaktors nicht nur sehr geholfen, sondern sind auch auf jeden Sonderwunsch und Änderungsvorschlag mit viel Geduld eingegangen. Technischen Fragen konnten jederzeit an sie gerichtet werden und wurden von ihnen gerne und ausführlich beantwortet.

Schließlich will ich meiner Familie für die Motivation, den Rückhalt und für die finanzielle, sowie moralische Unterstützung während dieser Arbeit und während meines gesamten Medizinstudiums herzlichst danken. Die konstruktive Kritik meiner Mutter bei der Korrektur dieser Arbeit will ich hier ebenso nicht unerwähnt lassen, wie den medizinischen Rat meines Vaters, der mir außerdem einige Bilder zur Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand