

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

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Tissue Engineering von zellbesiedelten Polyurethan-Aortenklappenprothesen –  
Einfluss von in-vitro Präkonditionierung im pulsatilen Bioreaktor**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Maximilian Peter Erlmeier**

aus

**Landshut**

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nawid Khaladj  
Prof. Dr. med. Peter Müller  
Prof. Dr. med. Georg Nollert

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr.-Ing. Bassil Akra  
Dr. med. Nikolaus Thierfelder

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Kurzzusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Kurzzusammenfassung Deutsch</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Abstract in English</b>	<b>7</b>
<b>2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>9</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Operativer Herzklappenersatz</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Tissue Engineering</b>	<b>12</b>
3.2.1 Tissue Engineering Grundlagen	12
3.2.2 Kardiales Tissue Engineering	14
<b>3.3 Bioreaktoren</b>	<b>16</b>
3.3.1 Grundlagen und Geschichte von Bioreaktoren	17
3.3.2 Bioreaktoren im Tissue Engineering	19
3.3.3 Bioreaktoren im kardiovaskulären Tissue Engineering	22
<b>3.4 Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>4. Methoden</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Zellisolation und Zellkultivierung</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Polyurethan-Herzklappen</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Zellbesiedelung der Polyurethan-Herzklappen</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Konditionierung und highflow Perfusion</b>	<b>29</b>
4.4.1 Highflow Bioreaktor	30
4.4.2 Konditionierungs-Bioreaktor	33
<b>4.5 Analyse</b>	<b>36</b>
4.5.1 Immuncytochemie	37
4.5.2 Immunhistochemie	38
4.5.3 Rasterelektronenmikroskopie	40
4.5.4 Real time Polymerase Ketten Reaktion	42
<b>4.6 Statistische Analyse</b>	<b>43</b>

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>5.1 Videoendoskopische Kontrolle der periodischen Klappenöffnung</b>	<b>44</b>
<b>5.2 Effizienz der Zellbesiedelung</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Integrität des Zellüberzuges nach Perfusion</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Nachweis von extrazellulären Matrixproteinen</b>	<b>48</b>
<b>5.5 Darstellung von interzellulären Verbindungen</b>	<b>49</b>
<b>5.6 Färbung immunmodulatorischer Proteine</b>	<b>50</b>
<b>5.7 Ausschluss der Verunreinigung durch andere Zelltypen</b>	<b>51</b>
<b>5.8 Cytokin-Expression und rt-PCR</b>	<b>52</b>
5.8.1 Cytokin-Expression vor Perfusion in den Bioreaktoren	52
5.8.2 Cytokin-Expression nach Perfusion in den Bioreaktoren	53
<b>6. Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>71</b>
<b>Danksagung</b>	<b>81</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Besiedelung von Polyurethan-Herzklappen	<b>30</b>
<b>Abbildung 2:</b>	Bioreaktor (A) und computergesteuerte Antriebseinheit (B)	<b>32</b>
<b>Abbildung 3:</b>	Berlin Heart EXCOR®	<b>33</b>
<b>Abbildung 4:</b>	Aufbau des Konditionierungs-Bioreaktors	<b>36</b>
<b>Abbildung 5:</b>	Längs eröffneter Aortenbulbus	<b>37</b>
<b>Abbildung 6:</b>	Endoskopische Aufnahme der Klappenöffnung	<b>44</b>
<b>Abbildung 7:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Polyurethan-Herzklappen	<b>45</b>
<b>Abbildung 8:</b>	Immunhistochemische Untersuchungen von zellbeschichteten Polyurethan-Herzklappen	<b>46</b>
<b>Abbildung 9:</b>	Immunhistochemische Untersuchungen von zellbeschichteten Polyurethan-Herzklappen nach Perfusion in den Bioreaktoren	<b>47</b>
<b>Abbildung 10:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Polyurethan-Herzklappen nach Perfusion in den Bioreaktoren	<b>48</b>
<b>Abbildung 11:</b>	Immunhistochemische Färbungen gegen Kollagen IV und Fibronectin	<b>49</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Immunhistochemische Färbungen gegen Connexin-43 und VE-Cadherin	<b>50</b>
<b>Abbildung 13:</b>	Immunhistochemische Färbungen gegen ICAM und VCAM	<b>51</b>
<b>Abbildung 14:</b>	rt-PCR-Resultate der Zellkulturen und der Proben aus Gruppe A	<b>53</b>
<b>Abbildung 15:</b>	rt-PCR-Resultate der Proben aus Gruppe B	<b>54</b>
<b>Abbildung 16:</b>	Mittelwerte der rt-PCR-Resultate von IL-6 und MCP-1 nach Perfusion in den Bioreaktoren	<b>55</b>

# **1. Kurzzusammenfassung**

## **1.1 Kurzzusammenfassung Deutsch**

In fortgeschrittenen Stadien von Herzklappenerkrankungen stellt der Klappenersatz durch eine Herzklappenprothese eine anerkannte Therapie dar. Derzeit zugelassene und erhältliche Klappenprothesen sind limitiert durch folgende Faktoren: eingeschränkte Verfügbarkeit (z.B. Homograft), begrenzte Haltbarkeit (biologische Klappenprothesen) oder Blutungsrisiko durch erforderliche Antikoagulation (mechanische Klappenprothesen). Tissue engierte Herzklappenprothesen sind ein vielversprechender Ansatz, um diese Einschränkungen zu überwinden. Das Ziel dieser Arbeit ist es die mechanische Integrität der Zellschichten, inklusive der Ausbildung einer extrazellulären Matrix und Genexpressionsveränderungen auf tissue engierten Herzklappen zu vergleichen: eine Gruppe nach highflow Perfusion, und eine Gruppe nach highflow Perfusion mit vorangegangener niedrigeren Konditionierungs-Perfusion.

Polyurethan Herzklappen wurden in einem speziellen 3D-rotierbarem Bioreaktor dynamisch mit Fibroblasten und Endothelzellen aus humanen Vena saphena magna Segmenten beschichtet. Die besiedelten Polyurethanklappen wurden in zwei Bioreaktoren unterschiedlichen Fluss-Bedingungen ausgesetzt: Gruppe A (n = 6) ausschließlich im highflow Bioreaktor: 3 Tage, je 24 Stunden bei 1 l/min, 1.5 l/min, und anschließend bei 2 l/min; Gruppe B (n = 6): initial 5 Tage im Konditionierungs-Bioreaktor bei 1 l/min, mit anschließender Perfusion im highflow Bioreaktor für weitere 3 Tage, je 24 Stunden bei 1 l/min, 1.5 l/min, und bei 2 l/min. Gewebeproben wurden mittels Immunzytologie, Immunhistochemie, Rasterelektronenmikroskopie und real time Polymerase Kettenreaktion (rt-PCR) analysiert.

Die immunhistochemische Färbung ergab eine gleichmäßige Färbung des mehrlagigen Zellüberzuges in beiden Gruppen. Rasterelektronenmikroskopie zeigte ebenfalls eine konfluente Zellschicht in beiden Gruppen. Rt-PCR verzeichnete höhere Expressionen von IL-6 und MCP-1 in der Konditionierungs-Reaktor Gruppe. Immunhistochemisch konnte man in dieser Gruppe insgesamt eine stärkere

Expression extrazellulärer Matrixproteine sowie eine deutlichere Färbung des Zellüberzuges mit dem Hinweis auf höhere Zellschichten beobachten.

Wir konnten zeigen, dass highflow Perfusion nicht die Integrität der Zelloberfläche von besiedelten Polyurethanherzklappen kompromittiert. Bioreaktoren unserer Arbeitsgruppe ermöglichen Methoden, um die Reaktion von Zellen auf Scherkräfte in vitro zu erhöhen und letztendlich die mechanischen Eigenschaften von tissue engineerter kardiovaskulären Prothesen zu optimieren.

## **1.2 Abstract in English**

Valve replacement represents a common therapy for end staged valvular diseases. Currently used prostheses are limited by availability, durability or by the increased postoperative hemorrhagic risk. Tissue engineered heart valves are a promising approach to overcome the limitations of conventional heart valve prostheses. The aim of this study was to compare the mechanical integrity (including analysis of extracellular matrix proteins and gene expressions) of tissue engineered heart valves after highflow perfusion with and without pre-conditioning.

Non-degradable polyurethane heart valves were dynamically seeded with human saphenous vein fibroblasts and endothelial cells by using a special 3D-rotating bioreactor. Colonized polyurethane heart valves were exposed to variable flow conditions: Group A (n = 6): T1/1 = 24 h at 1 l/min, T1/2 = 24 h at 1.5 l/min, T1/3 = 24 h at 2 l/min; Group B (n = 6): T2/1 = 5 d at 1 l/min, T2/2 = 24 h at 1 l/min, T2/3 = 24 h at 1.5 l/min, T2/4 = 24 h at 2 l/min, using two bioreactor systems (highflow bioreactor and conditioning bioreactor). Samples were analyzed by immunohistochemistry, scanning electron microscopy, and real time polymerase chain reaction.

Immunohistochemistry staining revealed the mechanical integrity of endothelial cell and fibroblast layers in both groups. Scanning electron microscopy analysis demonstrated a stable cellular coating under both conditions. As shown by real time polymerase chain reaction, the conditioning bioreactor group results in an increase in IL-6 and MCP-1 expression.

We have demonstrated that highflow perfusion does not affect the integrity of the cellular coating of seeded polyurethane heart valves. Our bioreactors offer a method to improve the reaction of cells to shear stress *in vitro* and finally to enhance the mechanical properties of tissue engineered cardiovascular prostheses.



## 2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAD	Computer-aided Design
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag(e)
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
EZ	Endothelzelle(n)
EZM	extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblast(en)
FCS	Fetal Calf Serum
FGM	Fibroblast Growth Medium
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HF	highflow (Perfusion)
HFBR	highflow Bioreaktor
HSA	Humanes Serum Albumin
ICC	Immunzytochemie
I.E.	Internationale Einheiten
IHC	Immunhistochemie
K+HF	Konditionierungs- und highflow-Perfusion
KBR	Konditionierungs-Bioreaktor
kGy	Kilogray
l	Liter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
o.g.	oben genannt

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rt-PCR	real time polymerase chain reaction
sec	Sekunde(n)
TE	Tissue Engineering
U/min	Umdrehung(en) pro Minute
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## **3. Einleitung**

### **3.1 Operativer Herzklappenersatz**

Ab den frühen 1960er Jahren konnte ein wachsendes Spektrum von Patienten mit Herzklappenerkrankungen operativ behandelt werden. Voraussetzung hierfür war die Entwicklung der Herzlungenmaschine, sowie die Entwicklung von Herzklappenprothesen. Während den 1970er Jahren wurden eine Reihe verschiedener Prothesen-Modelle für den operativen Herzklappenersatz in vitro und in vivo untersucht, woraus Grundformen entstanden, die seit den 1980er Jahren in Form und Funktion ähnlich noch heute verwendet werden. Natürlich unterliegen diese einer ständigen Weiterentwicklung [1]. Diese Entwicklung ausgereifter Klappenmodelle und die Etablierung routinierter und sicherer Operationsverfahren führten zu rasant steigenden Operationszahlen. Aktuell wird jährlich bei ca. 275.000 Patienten ein operativer Herzklappenersatz durchgeführt, hauptsächlich unter der Verwendung von biologischen oder mechanischen Klappenprothesen [2].

Verfügbare Herzklappenprothesen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: mechanische Klappenprothesen und biologische Klappenprothesen. Ein biologischer Klappenersatz kann mittels einer biologischen Xenograftklappe, durch das Ersetzen mittels einer Allograftklappe (Homograft) und durch die Autotransplantation der Pulmonalklappe in Aortenposition (Ross-Operation) durchgeführt werden. Jede dieser Alternativen zeigt spezifische Vor- und Nachteile. Trotz akzeptabler Ergebnisse bezüglich der Lebensqualität nach Implantation einer mechanischen oder biologischen Herzklappenprothese ist keine der operativen Herzklappenersatz-Strategien perfekt. Mechanische Klappenprothesen haben den Vorteil einer sehr hohen Lebensdauer ohne Neigung zu Degeneration, jedoch besteht unabhängig vom Operationsergebnis ein erhöhtes Blutungsrisiko. Dieses Risiko ergibt sich aus der Notwendigkeit einer lebenslangen Antikoagulation mit entsprechend hohem kumulativen Risiko eines Blutungsereignisses unter der dauerhaften Einnahme einer therapeutischen Antikoagulation [3-5]. Ein unschlagbarer Vorteil von biologischen Klappenprothesen besteht darin, dass keine Antikoagulation erforderlich ist. Die Nachteile sind jedoch offensichtlich: limitierte Haltbarkeit und Lagerung vor der

Implantation, limitierte Verfügbarkeit von z.B. Homograftconduits sowie vorzeitige Verkalkung, immunologische Angreifbarkeit und Degeneration von implantierten Klappenprothesen – in der Folge strukturelle Klappendefekte [6-9]. In diesem Zusammenhang zeigten *Grunkemeier et al.* eine detaillierte und exzellente Übersicht über Langzeit-Haltbarkeit und Komplikationen von Klappenprothesen [10]. Diese Studie basiert auf mehr als 250 klinischen Studien inklusive mehr als 61.000 Klappenprothesen und einer kumulativen Erfahrung von 319.749 Klappenjahren.

Die Entwicklung von tissue engineerter Herzklappen ist ein vielversprechender Ansatz um die Limitationen von konventionellen Herzklappenprothesen zu überwinden. Tissue engineerter Herzklappen verfügen über lebende, autologe biologische Strukturen, deren thrombotisch inerte Oberflächen keine Antikoagulation benötigen.

### **3.2 Tissue Engineering**

Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde in seinem heutigen Inhalt und seiner heutigen Bedeutung erstmals in den frühen 1990er Jahren in Boston verwendet: *Vacanti et al.* veröffentlichten 1991 den Artikel „Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering“. So gesehen ist Tissue Engineering ein junges Fachgebiet der medizinischen Forschung. Wörtlich übersetzt bedeutet es: „Gewebekonstruktion“. Der Begriff „Engineering“ impliziert, dass dafür neben umfassender Kenntnis im Bereich der Medizin ebenfalls Wissen und Erkenntnisse aus Ingenieurs- und anderen Naturwissenschaften sowie der Medizintechnik essentiell sind.

#### **3.2.1 Tissue Engineering Grundlagen**

Im Tissue Engineering sind drei grundlegende Bausteine erforderlich: erstens ein Zellträgersystem (Gerüst, oder „Scaffold“), zweitens lebende Zellen und drittens ein Bioreaktor. Das Prinzip des Tissue Engineering beruht darauf, lebende Zellen zu entnehmen, diese außerhalb des Körpers (extracorporal) zu kultivieren und nach

erfolgter Vermehrung auf einer formgebenden Matrix dem Patienten zu implantieren. Entscheidend bei der Wahl des Materials für dieses Zellträgersystem ist die sog. Biokompatibilität. Sie ist ein Maß für die Akzeptanz und Verträglichkeit von Materialien durch Zellen oder Gewebe. Ein geeigneter Werkstoff muss viele biologische, physikalische und chemische Eigenschaften erfüllen. Hierzu zählen auch Atoxizität und eine adäquate Oberflächencharakteristik [11].

Defekte in unterschiedlichsten Geweben können mittels Tissue Engineering repariert bzw. gefüllt werden. Hierzu zählen unter anderem: Muskelgewebe, Bindegewebe, Knochen- und Knorpelgewebe, Herzklappen oder Blutgefäße. Heute ist es sogar möglich, ganze Organe des Menschen nachzubilden. So können die Funktionen erkrankter oder zerstörter Organe des Menschen durch ein tissue engineertes Organoid ersetzt werden [11-13].

Um diese verschiedenen Zielgewebe herzustellen, muss eine Vielzahl an Biomaterialien zur Verfügung stehen. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bei der Reimplantation des künstlichen Gewebes kommen auch autologe Zellen (zunehmend häufig Stammzellen) zum Einsatz. Die zuvor isolierten Zellen müssen in speziellen Bioreaktoren unter optimierten Kultivierungsbedingungen vermehrt und organspezifisch ausdifferenziert werden. Um die jeweiligen Bedürfnisse der unterschiedlichen Zellen zu befriedigen bzw. um deren Kultivierung und Proliferation zu optimieren, kommen komplexe Medien zum Einsatz, die zum Teil Serum und Wachstumsfaktoren enthalten.

Mechanische Reize sind ein weiterer essentieller Faktor für die Konstruktion funktionellen Gewebes. Im menschlichen Körper sind Zellen permanent mechanischen, chemischen und elektrischen Signalen und Gradienten ausgesetzt und werden durch diese stimuliert. Diese Reize und Stimuli können z.B. physikalische Stimulation durch Dehnung oder Druck sowie Pulsation sein. Dadurch werden Verhalten, Form, Eigenschaften, Phenotyp und die Proliferationsrate von Zellen in vivo beeinflusst [14]. Auch in vitro ist die Verbesserung und Beschleunigung der Anpassung von Gewebe in Bioreaktoren mittels mechanischen Kräften und Reizen etabliert. Wenn Flüssigkeit entlang der Oberfläche eines eingebrachten Zellträgersystems fließt, entsteht dort Scherspannung, „Scherstress“ oder „dynamischer Stress“. Man geht davon aus, dass Scherspannung einer der

wichtigsten mechanischen Reize ist, der zur Aktivierung von Mechanosignaltransduktion führt [15].

Dagegen erfolgt die primäre Kultivierung der Zell/Matrix-Konstrukte (Scaffolds) für das Tissue Engineering zunächst meist unter statischen Bedingungen, z.B. in Gewebekulturschalen. Unter statischen Bedingungen ist jedoch die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen auf bzw. innerhalb einer dreidimensionalen Matrix inhomogen (siehe Kapitel 3.3.1). Dies kann in verlangsamtem Wachstum bis hin zum Absterben des Gewebes auf der Matrix resultieren [16]. Für den klinischen Einsatz am Patienten sollte das tissue engierte Gewebekonstrukt möglichst schnell und funktionsfähig herzustellen sein. In den letzten Jahren führte dieser Anspruch dazu, dass individuell angepasste Bioreaktoren für eine schnelle kontrollierte und reproduzierbare Herstellung künstlicher Gewebe eingesetzt werden. Die Verwendung von Bioreaktoren gewährleistet eine bessere Versorgung der Zellen, sodass schneller ein biologisch aktives Gewebe unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen entsteht.

### ***3.2.2 Kardiales Tissue Engineering***

Natürlich kombiniert auch kardiales Tissue Engineering die Prinzipien und Methoden der Medizin mit Ingenieurwissenschaften und mit Naturwissenschaften. Somit werden biologische kardiovaskuläre Ersatzstrukturen entwickelt, die Funktionen von unterschiedlichen Gewebetypen wiederherstellen, aufrechterhalten oder sogar verbessern können [12]. Tissue engineertes Gewebe behält sogar das Potential sich zu reparieren und umzuorganisieren, was im Fall von Herzklappenprothesen dazu führen kann, dass verhindert wird, dass die Klappe später ein weiteres mal ersetzt werden muss. Um diese Ziele zu erreichen, beabsichtigt Tissue Engineering von Herzklappen, eine sich regenerierende funktionierende Struktur zu schaffen, die sowohl interstitielle Zellen als auch Endothelzellen enthält. Von tissue engineertem Gewebe wird ebenfalls erwartet, dass es fähig ist, extrazelluläre Matrix (EZM) zu erschaffen und kontinuierlich zu regenerieren, um strukturell und biomechanisch als Klappensegel zu funktionieren [16-21]. Die Erstellung einer kompletten Klappe inklusive eines tissue engineerten Klappengerüsts zeigte sich als äußerst kompliziert

[22]. Vor allem der Anspruch an strukturelle Stabilität des Klappengerüsts unter physiologischen Bedingungen mit entsprechend hohem pulsatilem Scherstress konnte bislang nur bedingt erfüllt werden. Um diese Limitierungen zu umgehen fokussieren wir in dieser Versuchsreihe auf das Besiedeln von synthetischen Klappengerüsten (sog. Scaffolds) mit humanen Zellen. Synthetische Klappengerüste können aus zwei unterschiedlichen Materialtypen bestehen: resorbierbare Materialien (z.B. Polyglykolsäure, Polyhydroxyalkanoat oder Polylactid-co-Glycolid) oder nicht-resorbierbare Materialien (z.B. Polyurethan). Bis jetzt gibt es zuversichtliche Ergebnisse für resorbierbare Materialien nur für den operativen Klappenersatz in Pulmonalisposition bei Schafen [23, 24].

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine zufriedenstellende Zell-Besiedelung von Polyurethan-Herzklappengerüsten mit adäquater Ausbildung von EZM-Proteinen zeigen [25]. Weiterführende Experimente bestätigten im direkten Vergleich der Besiedelung von Polyurethangerüsten mit Homografts das Potential von Polyurethangerüsten für Tissue Engineering [26]. Aufgrund ihrer Vorteile, wie z.B. struktureller Stabilität und non-Immunogenität [27], wurden Polyurethan-Herzklappengerüste den resorbierbaren Klappen vorgezogen und für diesen experimentellen Ansatz im Sinne einer weiterführenden Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe verwendet. Die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit des synthetischen Werkstoffes Polyurethan im Gegensatz zu der sehr limitierten Verfügbarkeit von z.B. Homografts trug zu diesem Entschluss bei. Eine Verwendung von resorbierbarem Trägermaterial wurde bei der Planung für diese Arbeit aufgrund der eingeschränkten strukturellen Stabilität resorbierbarer Materialien ausgeschlossen.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche unterschiedliche Zellquellen für das Tissue Engineering von Herzklappen erfolgreich eingesetzt. Es fehlt jedoch immer noch eine Empfehlung für die optimale Zellquelle. Aktuelle Ansätze verwenden autologe Zellen, welche aus humanen Vena saphena magna Segmenten, Nabelschnurgefäßen oder Nabelschnurblut, Amnionflüssigkeit, aus der Plazenta, Fettgewebe oder Knochenmarkszellen gewonnen werden [28-35]. Analog zu Stammzellen fetalen Ursprungs sind Stammzellen aus dem Knochenmark eine vielversprechende Zellquelle. Diese Zellen sind multipotent und grundsätzlich zur Differenzierung, Transformation und Regeneration fähig [28]. Der experimentelle Gebrauch von embryonalen Stammzellen ist jedoch mit kompliziertesten wissenschaftlichen und

ethischen Auflagen verbunden [36-40]. Für zukünftige praxisorientierte Therapieansätze ist diese Zellquelle außerdem unbrauchbar, da in der Regel keine körpereigenen embryonalen Stammzellen vorliegen, wenn der Zeitpunkt gekommen ist, an dem ein Patient einen operativen Herzklappenersatz benötigt. Dies ergibt sich aus dem meist fortgeschrittenen Alter dieser Patienten [10].

Für diese Studie wurden adulte, ausdifferenzierte Zellen (Endothelzellen und Fibroblasten) zum Besiedeln der Herzklappen ausgewählt, die aus humanen Vena saphena magna Segmenten gewonnen wurden. Mehrere Arbeiten haben bereits die Eignung von Vena saphena magna Segmenten als Zellquelle belegt [28, 29, 41], unter anderem auch in unserer Arbeitsgruppe [25, 26]. Um langfristig einen realisierbaren klinischen Bezug unserer tissue engineerten Herzklappen herzustellen, wurde bei der Auswahl des Trägermaterials und der Zellquelle Wert auf eine möglichst unkomplizierte Verfügbarkeit gelegt, auch im Hinblick auf die Verfügbarkeit für mögliche zukünftige Patienten. Der Entschluss zu Verwendung von Venensegmenten erfolgte zum einen, um o.g. Limitierungen im experimentellen Umgang mit Stammzellen zu umgehen. Zum anderen, da isolierte Venen-Segmente nach aorto-koronaren Bypassoperationen als Rest-Segmente oder für den Bypass unbrauchbare Segmente leicht zugänglich sind. Die schriftliche Zustimmung der jeweiligen Patienten zur Verwendung der Venensegmente wurde eingeholt.

### **3.3 Bioreaktoren**

Wie bereits erläutert, benötigt man im Tissue Engineering neben einem Zellträgersystem und lebenden Zellen einen Bioreaktor. Diese Bioreaktoren können in Form und Funktion jedoch extrem unterschiedlich ausfallen. Allgemein gilt, dass ein Bioreaktor per definitionem ein geschlossener Raum bzw. ein System ist, in dem bestimmte Mikroorganismen, Zellen oder kleine Pflanzen unter möglichst optimalen Bedingungen kultiviert werden können. In diesem Sinne ist der kleinste Bioreaktor eine vitale Zelle, die durch die Zellwand bzw. –membran von der Umwelt abgegrenzt ist [14]. „Abgegrenzt“ bedeutet nicht „abgeschlossen“ im Sinne von „versiegelt“, vielmehr findet ein reger Stoff- und Wärmeaustausch mit der Umgebung statt. Substrat tritt durch die Membran in die Zelle, Metabolite werden ausgeschleust. Dies



gilt im Falle von aeroben Mikroorganismen ebenfalls für den Gasaustausch: O<sub>2</sub> wird über die Zellwand aufgenommen, CO<sub>2</sub> abgegeben. Analog zur einzelnen Zelle sind diese Eigenschaften unabdingbar für die regelrechte Funktion eines technisch verwendeten Bioreaktors. Der Betrieb eines Bioreaktors ist somit eine biotechnologische Anwendung, die biologische Prozesse in technischen Einrichtungen nutzt bzw. nutzbar macht [14].

### **3.3.1 Grundlagen und Geschichte von Bioreaktoren**

Erste Bioreaktoren kamen vor ca. 5000 Jahren bei der Herstellung von Wein und Bier zur Anwendung. Das Prinzip dieser primitiven Gärgefäße wird bis heute in hochtechnisierten Braukesseln fortgeführt. Ähnlich wie Braukessel zählen heute die seit Jahrtausenden verwendeten Vorrichtungen zur Herstellung verschiedener Milchprodukte mittels Bakterien oder Enzymen technisch zu den Bioreaktoren. Aufgrund der Weiterentwicklung der Biotechnologie, vor allem durch wesentliche Fortschritte in der Mikrobiologie im 19. Jahrhundert, sowie der Molekularbiologie und Gentechnik ab Mitte des 20. Jahrhunderts konnten immer mehr Anwendungen entwickelt werden. Dadurch ergibt sich heute eine Vielzahl an Anwendungen von Bioreaktoren im Bereich der Medizintechnik, der pharmazeutischen Industrie, in der Herstellung von Grundchemikalien für die Chemie- und Lebensmittelindustrie, aber auch in der Abwasser- und Müllentsorgung. Zweck der Kultivierung in einem Bioreaktor kann dabei die Gewinnung von Zellen oder Bestandteilen der Zellen sowie die Produktion von Stoffwechselprodukten sein. Entsprechend o.g. Anwendungsgebiete können diese z.B. als Wirkstoff in der pharmazeutischen Industrie oder als Grundchemikalie in der chemischen Industrie verwendet werden. Auch der Abbau von chemischen Verbindungen kann in Bioreaktoren stattfinden, wie z. B. bei der Abwasserreinigung in Kläranlagen [14].

Da in Bioreaktoren unterschiedlichste Organismen für verschiedenste Zwecke kultiviert werden, müssen mehrere Reaktorvarianten in unterschiedlicher Ausführung zur Verfügung stehen. Industriell verwendete Bioreaktoren sind häufig Rührkesselreaktoren aus Metall, die ein Volumen von wenigen bis tausenden Litern fassen können und mit Substrat gefüllt werden. Aber auch sich stark

unterscheidende Varianten, wie z. B. Membranbioreaktoren, Schlaufenreaktoren, Wirbelschichtreaktoren, Festbettreaktoren, Photobioreaktoren, Einweg-Bioreaktoren für Säugetierzellen sowie Bioreaktoren für das Tissue Engineering werden verwendet [14].

Eine Gemeinsamkeit aller Bioreaktoren ist die Notwendigkeit von möglichst physiologischen Bedingungen, um die Kultivierung und damit die Effizienz, zu optimieren. Hierzu müssen die Zusammensetzung des Substrats (oder der Nährstoffe), Gaskonzentrationen, der pH-Wert, Sterilität sowie die Zufuhr von Substrat und die Entfernung von (Abfall-)Produkten exakt steuerbar und kontrollierbar sein. Gerade bei industriell eingesetzten Bioreaktoren stellt dies eine große Herausforderung dar. Im Vergleich zum oben genannten Beispiel der einzelnen Zelle, in der aufgrund der kurzen Diffusionswege innerhalb der Zelle keine Stofftransportlimitierungen existieren, ist dies in einem Bioreaktor im technischen Maßstab oft limitierend. Würde man einen großen Reaktionsraum sich selbst überlassen, so würden sich als Folge lokale Konzentrationsunterschiede ergeben (z.B. durch Zufuhr von Nährmedium und Sauerstoff, Entfernung von Metaboliten und CO<sub>2</sub>, lokale Wärmequellen etc.). Außerdem würde es zu Schichtungen durch Dichteunterschiede (z.B. Sedimentation der Mikroorganismen) bei mangelnder Durchmischung kommen und damit zu Zonen mit Konzentrationsanreicherung und Zonen mit Unterversorgung. Für eine hohe Umsatzrate ist eine gute Durchmischung (Homogenisierung) des gesamten Reaktionsraumes erforderlich. Die hierfür notwendigen Rührereinheiten (Mischer) müssen in der Regel noch weitere Aufgaben übernehmen: z. B. Suspendieren eines Feststoffes, Emulgieren zweier ineinander nicht löslicher Flüssigkeiten oder Dispergieren eines Gases (z.B. O<sub>2</sub>) in einer Flüssigkeit [14].

Zudem werden hohe Reinheitsansprüche an die gewonnenen Produkte gestellt, vor allem in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie, sowie in der Medizintechnik. In diesen Fällen ist meist eine komplette Isolation der Prozesse nötig [14, 42].

### **3.3.2 Bioreaktoren im Tissue Engineering**

Anders als im Abschnitt 3.3.1, in dem die Zellkultivierung der Produktion oder dem Abbau von bestimmten Stoffen dient, haben Bioreaktoren im Tissue Engineering ein anderes Ziel. Hier werden künstliche Gewebe unter der Verwendung von geeigneten Biomatrices, Zellen und Bioreaktoren gezüchtet. Bioreaktoren sind hierfür aufgrund zweier Hauptgründe essentiell: erstens, da sie eine in-vitro Umgebung erzeugen, die in-vivo Bedingungen für lebende Zellen simuliert und dadurch Wachstum, Proliferation, Transformation und Regeneration ermöglichen. Zweitens, da Bioreaktoren systematische Studien und Untersuchungen ermöglichen, wie lebende Gewebe auf unterschiedlichste mechanische und biomechanische Reize und Stimulationen reagieren und sich aufgrund von umgebungsbedingten Stress anpassen. Diese Attribute sind nicht nur für kontrollierte, reproduzierbare Untersuchungen und Forschung essentiell, sondern auch für die standardisierte Anfertigung von tissue engineerter Konstruktionen für klinische Anwendungen in der Zukunft [12].

Zur Isolation und Kultivierung einzelner Zelltypen gibt es seit langer Zeit bewährte und effiziente Techniken, wohingegen die Herstellung von tissue engineerter Konstrukten mit lebenden Zellen eine relativ junge Entwicklung darstellt. Damit ein Gewebe mit spezifischer Funktion entstehen kann, müssen multiple Voraussetzungen erfüllt sein, um den jeweiligen Zelltypen im Gewebe Proliferation und Differenzierung zu ermöglichen. Daher ist die Generierung von solchen lebenden Geweben experimentell wesentlich aufwändiger als die Vermehrung von Zellen in einer Kulturschale (siehe Kapitel 3.2.1). Aber auch die Züchtung von Zellen in z.B. Zellkulturflaschen kann bereits zu Bioreaktoren gezählt werden. Hier werden die Zellen unter konstanten Bedingungen von 37 °C und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5% im Brutschrank optimal bebrütet. Die Kultivierung der Zellen erfolgt mittels spezieller Nährmedien (z.T. inklusive Wachstumsfaktoren, antibiotischer Infektions- und Kontaminationsprophylaxe) innerhalb eines engen pH-Zielbereichs. Diese statische Kultivierungsmethode dient sowohl der reinen „Vermehrung“ und Züchtung von Zellen zur Weiterverarbeitung als auch einer adhärennten Monolayer-Besiedelung von planen Oberflächen. Die in Kapitel 3.3.1 erläuterten Stofftransportlimitierungen spielen hier eine untergeordnete Rolle, da die Kontaktfläche zwischen Zellen und Zellmedium sehr groß ist und das Konzentrationsgefälle innerhalb der geringen

Schichtdicke nur gering ausfällt. Der Fortschritt der Vermehrung der Zellen bis zur konfluenten Zellschicht kann in den durchsichtigen Zellkulturflaschen direkt unter einem Lichtmikroskop mit Polarisationsfilter beobachtet werden [14, 15, 43, 44].

Die Limitierungen dieser „primitiven“ Bioreaktorform werden vor allem bei der Besiedelung von dreidimensionalen Strukturen (z.T. mit Lumina und Hohlräumen) offensichtlich: hier gelingt es nicht, eine gleichmäßige Zellschicht auf allen Oberflächen zu erzeugen. Die Zellen würden sich der Schwerkraft folgend nur auf den nach oben gerichteten Flächen anlagern. Das Ziel, eine effektive und gleichmäßige Zellschicht auf allen Oberflächen zu erhalten, erreicht man durch dynamische Besiedelung.

Weiterentwickelte Bioreaktoren zur dynamischen Kultivierung können in zwei Grundtypen eingeteilt werden: erstens Besiedelungsbioreaktoren und zweitens Konditionierungsbioreaktoren.

**Besiedelungsbioreaktoren:** Die einfachste Form eines Besiedelungsreaktors ist eine sog. Spinnerflasche (Englisch: „spinner flask“), welche für die Kultivierung von Suspensionszellen entwickelt wurde. Um das Konzentrationsgefälle im Nährmedium in einer Flasche aufzuheben und den Gasaustausch zu optimieren, wird das Medium ständig durch einen Magnetrührer am Boden durchmischt. Auch adhärent wachsende Zellen können mittels einer Spinnerflasche auf Zellträgersystemen kultiviert werden: dabei wird ein zu besiedelndes dreidimensionales Gerüst z.B. am Deckel der Flasche fixiert und von Medium und freien Zellen umströmt. Nach und nach setzen sich die Zellen auf dem Gerüst ab und proliferieren. Durch die Durchmischung des Mediums ist eine gleichmäßige Nährstoffversorgung gewährleistet. Spinnerflaschen finden unter anderem bei der Kultivierung von Zell/Polymer-Konstrukten bei der Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe Verwendung. Andere Formen von Besiedelungsbioreaktoren kommen ohne Rührvorrichtung aus. Dazu zählt z.B. der „rotating wall vessel reactor“, welcher bereits Anfang der 1990er Jahre von der NASA entwickelt wurde. Durch eine Rotation des gesamten Gefäßes kommt es zu einer Durchmischung des Mediums im Inneren. In anderen rotierenden Besiedelungsreaktoren können ebenfalls eingebrachte dreidimensionale Zellträgersysteme besiedelt werden, mit dem Ziel, eine effektive und gleichmäßige Zellschicht auf allen Oberflächen zu erreichen. Dabei

wird das komplette Gefäß inklusive Zellträgersystem und Zellsuspension in eine 3D-Rotations- oder Taumelbewegung mit konstanten Dreh- und Ruhezeiten im Intervall versetzt. Während des Drehvorganges wird die Zellsuspension gemischt, was zu einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen führt. Außerdem weist am Ende einer jeden Drehsequenz eine andere Fläche des Zellträgers nach oben, die in der darauffolgenden Ruhezeit besiedelt werden kann. In den Ruhezeiten lagern sich die Zellen auf den nach oben gerichteten Flächen der Schwerkraft folgend ab. Diese dynamische Zellbesiedelung führt dazu, dass nach ausreichend langer Zeit mit entsprechend vielen aufeinanderfolgenden Ruhe- und Bewegungsintervallen idealerweise jeder Flächenabschnitt des Zellträgers zeitweise nach „oben“ gerichtet war. Dadurch können sich die Zellen auf allen Oberflächen des Zellträgers gleichmäßig absetzen. Rotierende Besiedelungsbioreaktoren finden unter anderem für die Differenzierung von Zellen zu Knorpel- und Nervengewebe und im kardiovaskulärem Tissue Engineering Anwendung [14, 15, 43].

**Konditionierungsbioreaktoren:** Diese Gruppe von Bioreaktoren beinhaltet vor allem komplexere Systeme, wie Perfusionsbioreaktoren. Hier werden dreidimensionale Gerüstmaterialien mit Kulturmedium durchströmt. Eingebachte Zellträgersysteme können entweder bereits vorher (im Besiedelungsbioreaktor) mit Zellen besiedelt worden sein oder im Perfusionsbioreaktor besiedelt werden. In diesem Fall wird dem Perfusionskreislauf eine Zellsuspension zugeführt.

Im Gegensatz zu den gängigen Besiedelungsreaktoren besteht in den meisten Konditionierungsbioreaktoren die Möglichkeit frisches Kulturmedium zu- sowie verbrauchtes Medium abzuführen. Das Volumen im Reaktionsraum bleibt während der Kultivierung konstant. Mit dem Wechsel des verbrauchten Mediums werden zusätzlich potentiell toxisch wirkende Stoffwechselprodukte entfernt. Über die Regelung der Flussrate kann der auf die Zellen wirkende Scherstress variiert werden. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, ist eine Gewöhnung an chemische und physikalische Stressoren grundlegend für die Gewährleistung der Differenzierung lebender Zellen und deren Adaptation an exogene Bedingungen [45, 46]. Neben Scherstress kommen auch andere mechanische Reize wie Zug, Druck und/oder Reibung z.B. in der Herstellung orthopädischer TE-Produkte zum Einsatz. Eine kontrollierte Steuerung mit der Option zur Steigerung dieser Reize ist für eine optimale Konditionierung unerlässlich. Ziel der Konditionierung ist es, dass sich

vorliegende Zellen an die äußerlichen Reize adaptieren und so zur Selbstorganisation bzw. Differenzierung stimuliert werden. Dafür werden Konditionierungsbioreaktoren unter anderem für Applikationen im Bereich des Tissue Engineering von Knochen- und Knorpelkonstrukten, und vor allem im kardiovaskulären Tissue Engineering entwickelt [14, 43, 44, 47].

### **3.3.3 Bioreaktoren im kardiovaskulären Tissue Engineering**

Im Bereich des kardiovaskulären Tissue Engineering ist mechanische Stimulation ebenfalls essentiell. Hier ist eine pulsatile Belastung physiologisch, wie sie in-vivo in den Blutgefäßen durch die Herzaktion hervorgerufen wird, womit sie sich von Bioreaktoren für Knochen-Knorpel-Konstrukte unterscheiden. Bioreaktorsysteme im kardiovaskulären Bereich bestehen meistens aus dem gewebetragenden Reaktionsraum und einer Antriebseinheit, welche über Schlauchsysteme verbunden sind. Es existieren auch Bioreaktoren, die ohne Schlauchsysteme auskommen.

Um die Zellkultivierung und Proliferation zu optimieren, werden unterschiedliche Zellmedien mit entsprechenden Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Das Lumen wird nun mit Medium pulsatil durchströmt, was zu einer physiologischen Belastung des Zellträgersystems und der darauf angesiedelten Zellen führt. Die durch das in-vitro durchströmende Medium entstehenden Scherkräfte sowie radiale Dehnung der Wand werden analog wie beim Herzschlag in-vivo erzeugt. Durch die Verwendung von dehnbaren Trägermaterialien kann sogar die „Windkessel“-Funktion von arteriellen Gefäßen imitiert werden: Bei der Herzkontraktion (Systole) dehnen sich die Gefäße aufgrund des Spitzenblutdruckes aus und ziehen sich in der Füllungsphase des Herzens (Diastole) bei geschlossener Aortenklappe, wieder in ihre ursprüngliche Form zurück. Dadurch wird das im Gefäß stehende Blutvolumen verdrängt, wodurch bei kompetenter Aortenklappe ein gerichteter Blutfluss während der Diastole entsteht.

Flussabhängiger Scherstress wird regelmäßig als mechanischer Stimulus im kardiovaskulären Tissue Engineering verwendet [48]. Das Ziel ist hier: so viel mechanischer Stress wie möglich, so wenig wie nötig. Sonst nimmt die Zelloberfläche durch den mechanischen Reiz selbst Schaden [17, 46, 49, 50].

Demzufolge ist das Generieren einer stabilen und konfluenten Endothelzellschicht auf dem Klappengerüst eine große Herausforderung [45]. Diese Beschichtung von dem Lumen zugewandten Oberflächen im Blutstrom mit Endothelzellen erfüllt diverse wichtige Funktionen: von Barrierefunktion über Ernährung bis hin zu immunmodulatorischen Aufgaben [51, 52]. Je nach Versuchsaufbau und Zielsetzung können auch andere Zelltypen zum Einsatz kommen, z.B. glatte Muskelzellen, um die Wand eines Blutgefäßes aufzubauen.

Wie bereits erwähnt müssen Zellen in Bioreaktoren kultiviert werden, um die Proliferation und Differenzierung von hoch komplexen Zellstrukturen zu ermöglichen. Bioreaktoren üben Reize und Scherstress auf die eingebrachten Konstrukte (Prothesen und Transplantate) aus. Es stellte sich heraus, dass Zellen kaum proliferieren und keine organisierten Gewebe formen können, wenn diese exogenen Signale fehlen oder unpassend gewählt wurden [53]. Das kann sogar zu Dedifferenzierung der Zellen führen, was in Atrophie ohne Ausbildung einer extrazellulären Matrix resultiert [15]. *Aleksieva et al.* publizierten kürzlich vielversprechende Resultate von dynamisch kultivierten tissue engineerter Herzklappen in einem neu entwickelten pulsatilen Konditionierungs-Bioreaktor. Hier konnte eine bessere Zellverteilung und ein stärker ausgeprägter Zellüberzug gezeigt werden als bei statischer Kultivierung [25].

Zusammenfassend sind die Hauptaufgaben, die ein Bioreaktor erfüllen muss, folgende: Versorgung mit Nährstoffen, Abtransport von katabolen Produkten, Kontrolle der Temperatur, Überwachung und Anpassung des pH-Wertes der Lösungen und die Ausübung von mechanischen Reizen zur Zellstimulation [14, 15, 17, 43, 44].

### **3.4 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Studie ist es, die Integrität der Zellschichten auf tissue engineerter Herzklappen sowie die Ausbildung von extrazellulärer Matrix und Genexpressionsveränderungen nach verschiedenen dynamischen Kultivierungsregimen zu vergleichen. Hierbei werden Fibroblasten und Endothelzellen auf Polyurethan Herzklappengerüste angesiedelt und zwei unterschiedlichen Perfusions-Schemen

zugeführt: Die erste Gruppe wird nach statischer Kultivierung direkt in einem pulsatilen highflow Bioreaktor perfundiert. Die Herzklappen der zweiten Gruppe werden nach statischer Kultivierung zusätzlich in einem pulsatilen lowflow Bioreaktor konditioniert, bevor sie analog zur ersten Gruppe im highflow Bioreaktor perfundiert werden.

Die Zellkonfluenz, die Formation von extrazellulärer Matrix, und die inflammatorische Reaktion anhand einiger Cytokine werden untersucht, um die Ergebnisse der beiden Gruppen zu vergleichen.



## **4. Methoden**

### **4.1 Zellisolation und Zellkultivierung**

Endothelzellen (EZ) und Fibroblasten (FB) wurden aus Segmenten der Vena saphena magna isoliert, die als Reste nach aortokoronaren Bypass-Operationen unserer Herzchirurgischen Klinik angefallen sind – teils Rest-Segmente, teils für die Bypass-Operation unbrauchbare Venenstücke. Verbliebene Gefäßstücke der Vena saphena wurden nur nach vorangegangener freiwilliger und schriftlicher Zustimmung der jeweiligen Patienten verwendet und im Folgenden anonym weiter verarbeitet – ohne individuelle patientenbezogene Daten. Die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigte die Verwendung dieser Restvenen für die Isolation von Zellen und deren Weiterverwendung für diese Studie.

Das enzymatische Lösen und die Isolierung der Zellen wurden bereits mehrfach beschrieben [54, 55]. Die Venensegmente wurden postoperativ in Zellmedium M199 (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) ergänzt mit 0,2 % Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 4 °C gelagert. Um eine größtmögliche Zellausbeute zu garantieren, wurde die Lagerungsdauer auf maximal 6 Tage limitiert. Sehr kleine Venensegmente unter 3,5 cm sowie offensichtlich beschädigte Gefäße wurden ebenfalls ausgeschlossen und verworfen. Zunächst wurden beide Enden eines Venenstückes kanüliert und anschließend mit vorgefertigtem Spülmedium durchspült (Spülmedium: 494 ml M199 + 5000 I.E. Heparin; B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland + 50 mg Gentamycin; Invitrogen AG, Darmstadt, Deutschland). Zur Isolation von EZ wurden die Venensegmente mit 14 mg Kollagenase Typ II (Worthington Biochemical Corporation / CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland) in 10 ml 1 %-igem Humanen Serum Albumin (HSA; ZLB Behring, Bern, Schweiz) in PBS (phosphate buffered saline, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) für 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit Medium M199 ausgewaschen und die enzymatische Reaktion mit der Stopplösung angehalten („Stopplösung 1“: Medium M199 und 20 % fetal calf serum; FCS; Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz). Die Zellsuspension wurde bei 500 U / min für 7 Minuten zentrifugiert und die abgesetzten

Zellen in Endothelzellmedium re-suspendiert und kultiviert (Endothelzellmedium: endothelial cell growth medium; Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland + 6 % FCS; Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz + 0.2 % Penicillin/Streptomycin; Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland). Um eine zweite Endothelzellfraktion zu gewinnen, wurde dieser Vorgang am selben Venensegment ein zweites Mal wiederholt.

Zur Isolation von FB wurden die Venensegmente in kleine Stücke zu je ca. 1 x 1 mm geschnitten und unter einem Deckglas, welches an den Ecken mit Silikontropfen (Baysilone®, GE Bayer Silicones, Düsseldorf, Deutschland) fixiert wurde, in Fibroblastenmedium kultiviert (Fibroblastenmedium: FGM; fibroblast growth medium; Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland + 11 % FCS; Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz + 0.2 % Penicillin/Streptomycin; Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland). Nachdem Zellkonfluenz erreicht wurde, wurden die Zellen mit Trypsin (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland; 1:20 in PBS) gelöst und die enzymatische Reaktion mittels einer Stopplösung („Stopplösung 2“: Zellmedium zu FCS im Verhältnis 10:1) gestoppt. Analog zur Endothelzellgewinnung wurde hier die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet re-suspendiert und mit entsprechendem Nährmedium in Zellkulturflaschen (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) kultiviert.

Die Zellkulturflaschen für EZ und FB wurden im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. In der primären Kultivierungsphase wurde das Medium nach 3 Tagen für EZ, und nach 5-7 Tagen für FB gewechselt. Im Folgenden wurde das Medium bei beiden Zelltypen drei Mal pro Woche gewechselt (Montag, Mittwoch, Freitag). Erst wenn sich eine konfluente Zellschicht am Boden der Kulturflaschen zeigte, wurden die EZ und FB weiter prozessiert. Restliches Nährmedium und Stoffwechselabfallprodukte mussten vollständig entfernt werden, um eine Inaktivierung des Trypsins im Folgenden zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gespült, und anschließend mit Trypsin (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland; 1:20 in PBS) gelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde nach Stoppen der enzymatischen Reaktion mittels einer Stopplösung („Stopplösung 2“: Zellmedium zu FCS im Verhältnis 10:1) bei 500 U / min für 7 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert und auf weitere Zellkulturflaschen verteilt: in den ersten Schritten von einer 12,5 cm<sup>2</sup> auf eine 75 cm<sup>2</sup> und anschließend auf eine 162 cm<sup>2</sup>

fassende Flasche. „cm<sup>2</sup>“ bezieht sich hierbei auf die Kultivierungsoberfläche der jeweiligen Zellkulturflasche. Danach wurden die Zellen einer 162 cm<sup>2</sup> fassenden Kulturflasche jeweils auf 3 neue 162 cm<sup>2</sup> fassende Kulturflaschen verteilt, bis nach 3 weiteren Schritten 27 „volle“ Zellkulturflaschen mit konfluenten Zellschichten zur Verfügung standen. Das definierte Ziel von 1,5 Millionen Zellen pro cm<sup>2</sup> Zellträgeroberfläche am Herzklappengerüst führt zu einer errechneten benötigten Zellzahl von 90 Millionen Zellen (errechnete Oberfläche der Polyurethan-Herzklappen: 60 cm<sup>2</sup>). Eine 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche beinhaltet bei Zellkonfluenz durchschnittlich 3,5 Millionen Zellen, was zu dem Bedarf an mind. 25 Zellkulturflaschen pro Besiedelungsschritt führte.

#### **4.2 Polyurethan-Herzklappen**

Die verwendeten Herzklappen wurden vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) in Denkendorf nach einem patentierten Verfahren hergestellt (Patent DE 28 06 030 C2). Im sogenannten Sprühverfahren wurden nicht resorbierbare Polyurethan-Fasern in Chloroform gelöst auf einen Negativabdruck aus Gummi gesprüht. Die dabei zufällig im Raum ausgerichteten Polyurethan-Fasern besitzen einen mittleren Durchmesser von  $1,55 \pm 0,44 \mu\text{m}$ , bei einer mittleren Polyurethan-Schichtdicke von 0,3 mm. Das Sprühverfahren ergab nach Herstellerangaben einen mittleren Polyurethananteil der Aortenwand von  $67 \pm 2 \%$ , und an den Klappensegeln von  $73 \pm 10 \%$ . Die Größe der entstandenen Poren wurde an der Aortenwand im Mittel mit  $3,5 \pm 0,49 \mu\text{m}$ , und an den Klappensegeln mit  $5,9 \pm 0,39 \mu\text{m}$  gemessen.

Nach Fertigstellung wurden die Polyurethan-Herzklappen mittels Gammastrahlung mit einer Energiedosis von 10 kGy in einer für die Sterilisation von medizinischen Produkten zertifizierten Einrichtung sterilisiert.

Um eine sichere und praktische Handhabung der Herzklappen im weiteren Versuchsablauf zu gewährleisten, wurden die Polyurethanklappen an ein spezielles Teflon<sup>TM</sup>-Gerüst fixiert (Abb. 1A). Dies erfolgte mittels einer fortlaufenden Naht mit einem nicht resorbierbaren chirurgischen Faden (Prolene 3/0, Resorba GmbH, Nürnberg, Deutschland). Die Teflon<sup>TM</sup>-Halterung wurde passend für den

Besiedelungszyylinder sowie für beide Bioreaktoren (Konditionierungs- und highflow-Bioreaktor) konzipiert.

### **4.3 Zellbesiedelung der Polyurethan-Herzklappen**

Um die Besiedelung der Oberflächen mit EZ zu optimieren, wurden die Polyurethangerüste zuerst mit FB und anschließend mit EZ besiedelt. Dies geschah in zwei Schritten in einem 3D-rotierbaren Besiedelungszyylinder (Abb. 1B) [56, 57]. Für die Beschichtung der Scaffolds wurde der Besiedelungszyylinder mit einer Polyurethanklappe zusammen mit der Zellsuspension, welche die erforderlichen 90 Millionen Zellen enthielt, und dem jeweiligen Zellmedium befüllt. Zur Zellzahlermittlung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet.

Bei jedem Experiment wurden trypsinisierte und resuspendierten FB in 100 ml angereichertem Fibroblastenmedium für 24 Stunden dynamisch auf die nativen Polyurethangerüste angesiedelt. Durch die 2 Minuten lange Drehung des Besiedelungszyinders um 2 Achsen mit anschließender Standzeit von 30 Minuten wurde eine gleichmäßige 3-dimensionale Zellverteilung erreicht. Die Standzeit ist essentiell, damit sich die Zellen auf der Oberfläche der Herzklappe absetzen. Die Drehintervalle sorgen für eine gleichmäßige Verteilung auf allen Oberflächen der Herzklappe. Der Gasaustausch wurde durch eine Silikon-Membran an der Unterseite des Zylinders bewerkstelligt. Nach 24 Stunden wurden die frei schwimmenden Zellen im Medium gezählt. So wurde die Mindestzahl der auf der Herzklappe abgesetzten Zellen kalkuliert. Im Mittel wurde so jede Herzklappe initial mit 91,5 ( $\pm 1,4$ ) Millionen FB besiedelt. Nach der Besiedelung mit FB im Besiedelungszyylinder wurde die Herzklappe in ein Becherglas mit 400 ml angereichertem Fibroblastenmedium überführt (Abb. 1C). Hier erfolgte eine rein statische Kultivierung für 6 Tage. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Anschließend erfolgte die Besiedelung mit EZ im Besiedelungszyylinder. Dieser Vorgang wurde analog zu der Besiedelung mit FB durchgeführt, mit dem Unterschied, dass angereichertes Endothelzellmedium verwendet wurde. Im Mittel wurde jede mit FB vorbeschichtete Herzklappe mit 98,1 ( $\pm 4,9$ ) Millionen EZ besiedelt. Danach folgte ebenfalls eine statische Kultivierung für 6 Tage im Becherglas. Mit der

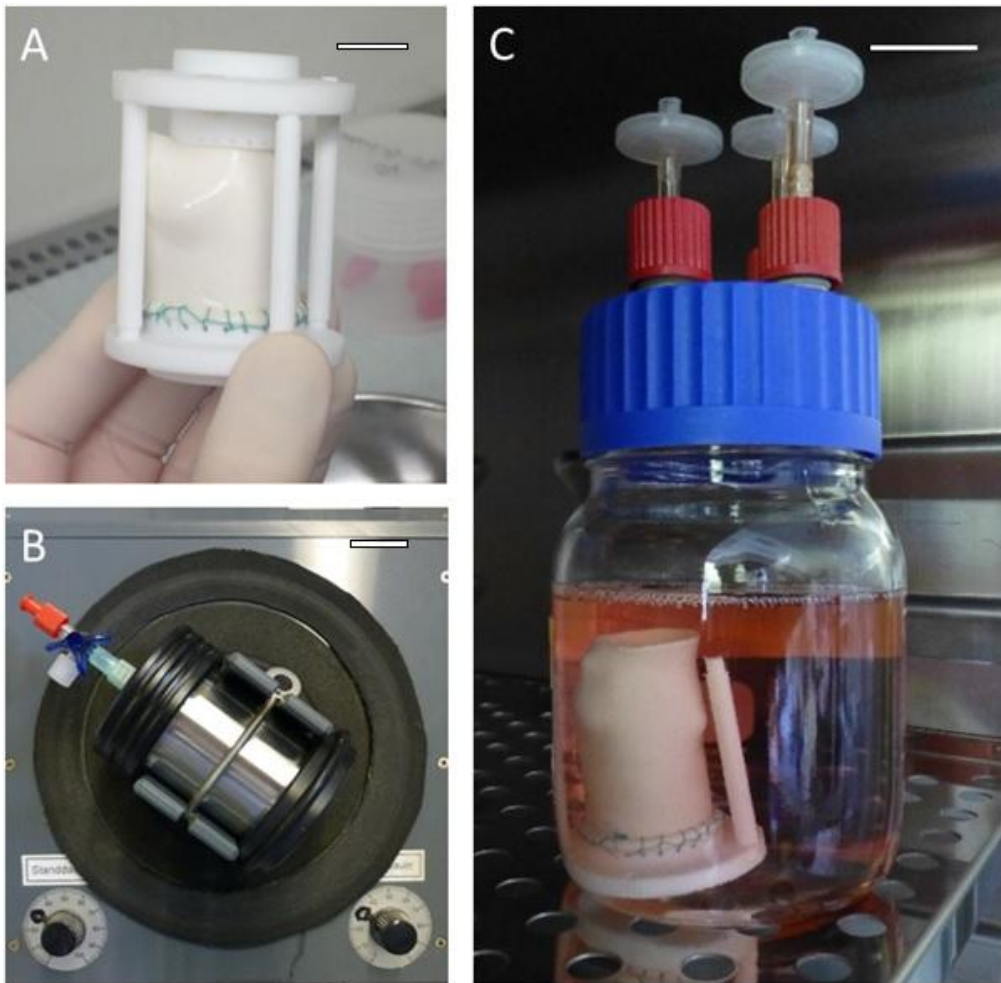
statischen Kultivierungsphase wurde das Etablieren einer stabileren Verbindung zwischen dem Trägermaterial und den Zellschichten bezweckt.

#### **4.4 Konditionierung und highflow Perfusion**

Nach der Besiedelung mit FB und EZ wurden die Herzklappen unterschiedlichen Flussbedingungen ausgesetzt. Dabei wurden zwei unterschiedliche pulsatile Bioreaktorsysteme verwendet: ein highflow-Bioreaktor (HFBR) und ein Konditionierungs-Bioreaktor (KBR). Im Vordergrund steht dabei eine möglichst exakte Imitation physiologischer Bedingungen und der sich ergebenden mechanischen Reize und stimulierenden Impulse auf lebende Zellen der besiedelten Herzklappen. Aufgrund der Befürchtung, dass ein pulsatile Fluss mit zu hoher Flussrate den Zellschichten einer frisch besiedelten Herzklappe schaden kann (und letzten Endes Zellformationen fortspült), wurde in einer zweiten Versuchsgruppe eine vorangehende Konditionierungsphase mit niedrigen Flussraten durchgeführt. In der Theorie sollen so die Zellformationen stabilisiert und vor allem die Expression stabilisierender extra-zellulärer Matrix stimuliert werden.

Gruppe A (n = 6) wurde demnach nur einer highflow Perfusion im HFBR ausgesetzt. Gruppe B (n = 6) wurde den identischen Flussbedingungen im selben HFBR ausgesetzt, allerdings mit vorangegangener Konditionierungsperfusion im KBR. Im Detail: Herzklappen der Gruppe A wurden 3 Tage im HFBR pulsatile kultiviert: je 24 Stunden bei 1 l/min, 1,5 l/min und 2 l/min Flussrate. Herzklappen der Gruppe B wurden primär 5 Tage im Konditionierungsbioreaktor bei 1 l/min perfundiert. Anschließend wurden die Klappen für 3 weitere Tage in den HFBR überführt: jeweils für 24 Stunden bei 1 l/min, 1,5 l/min, und bei 2 l/min Flussrate. Während der Kultivierung in den Bioreaktoren wurden die Herzklappen mit einem Medium perfundiert, welches zu 50 % aus Medium M199 und zu 50 % aus Endothelzellmedium bestand (Endothelzellmedium: EGM + 6 % FCS + 0,2 % Penicillin/Streptomycin). Alle zwei Tage wurde die Hälfte des angereicherten Mediums getauscht. Die Klappenfunktion und das vollständige Öffnen der Klappen wurden mittels Echtzeit-Endoskopie dokumentiert.

**Abbildung 1:**



**Abbildung 1: Besiedelung von Polyurethan-Herzklappen:** Die Herzklappengerüste beider Gruppen wurden an einem speziell konstruierten Teflon™-Gerüst mittels einer fortlaufenden Naht fixiert (A). Ein 3-dimensional rotierender Besiedelungszylinder (B) wurde für die Besiedelung der Herzklappengerüste mit FB und im Anschluss EZ für je 24 h bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> verwendet. Anschließend wurden die besiedelten Herzklappen statisch in einem Becherglas für je 6 Tage bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (C). Maßstab Balken: a = 10 mm, b = 20 mm, c = 30 mm.

Bildquelle: Herzchirurgisches Forschungslabor LMU München

#### **4.4.1 Highflow Bioreaktor**

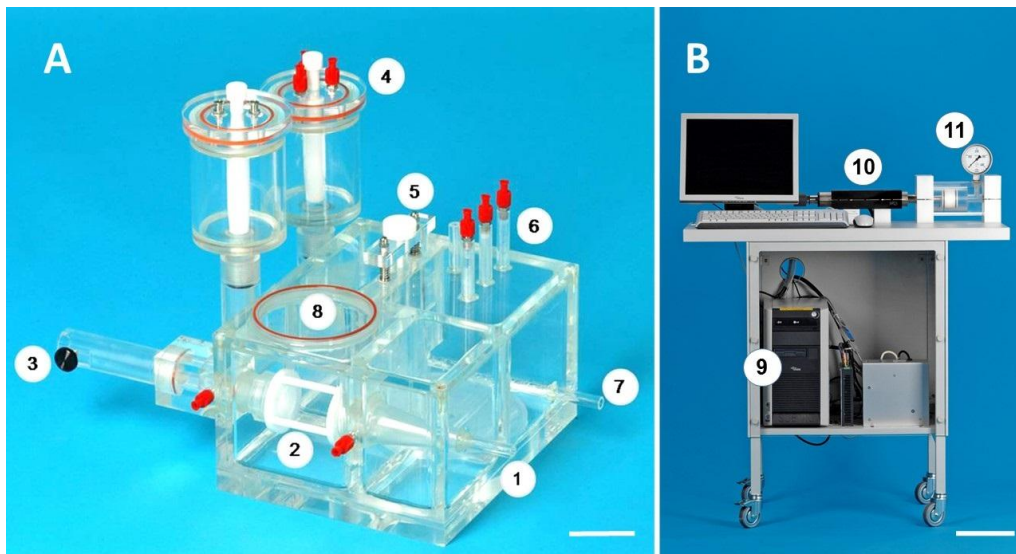
Der HFBR wurde unter der Verwendung der CAD Software CATIA V5R19 entwickelt und mit Hilfe der Klinikwerkstätten der Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-

Universität München bereits im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe hergestellt. Der HFBR ermöglicht einen pulsatilen Fluss mit einer Flussrate bis zu 5 l/min unter physiologischen Bedingungen, steuerbar über eine computer-gesteuerte externe Antriebseinheit (Abbildung 2B). Die Klappenfunktion im pulsatilen Fluss kann über ein Videoendoskop überwacht werden.

Das System wurde aus Acrylglas, Teflon™, Silikon und Edelstahl in Containerform gefertigt (Abbildung 2A). Es beinhaltet eine Vorrichtung zur Fixierung der Herzklappen, ein Medium-Sammel-Reservoir und eine dynamische Steuerung des Flusswiderstandes. Die Apparatur umfasst außerdem zwei Ausgleichskammern und eine Fixierung für das Endoskop. Der Deckel und die gesamte obere Bedeckung verfügen über multiple Anschlüsse zum Gasaustausch und zur Änderung der Menge des Zellmediums. Die Abmessungen wurden so gewählt, dass der Bioreaktor gassterilisiert werden kann und in einen Standardinkubator passt. Eine mikrobiologische Evaluation zeigte keine Kontamination nach einer Laufzeit von 96 Stunden. Das Design des Bioreaktors gewährleistet über die Montage eines Endoskopes (Abbildung 2A3) die visuelle Kontrolle des korrekten Öffnens und Schließens der Polyurethan-Herzklappen. Das Endoskop kann vorübergehend an der Basis des Bioreaktors montiert werden, ohne den Betrieb des Bioreaktors einstellen zu müssen. Um das Kontaminations- und Infektionsrisiko innerhalb des sterilen Bioreaktors zu minimieren, ist das Endoskop durch eine dünne Glasplatte vom sterilen Milieu innerhalb des Bioreaktors getrennt. Analog zu anderen Bioreaktoren müssen ebenfalls die Temperatur, die CO<sub>2</sub>-Konzentration und der pH-Wert konstant gehalten werden, um den lebenden Zellen auf den Herzklappen optimale Bedingungen zu bieten. Auf eine Kontrolle von Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb des HFBR kann verzichtet werden, da sich der Bioreaktor im Versuchsaufbau komplett in einem Standardinkubator befindet.

Die Antriebseinheit befindet sich im Versuchsaufbau außerhalb des Inkubators auf einem eigenen Wagen (Abbildung 2B). Über eine computergesteuerte Software (Abbildung 2B9) lässt sich der Motor (Abbildung 2B10) regulieren, der über eine Nocke mit einem hydraulischen Kolben (Abbildung 2B11) verbunden ist.

**Abbildung 2:**



**Abbildung 2: Bioreaktor (A) und computergesteuerte Antriebseinheit (B).** Der highflow-Bioreaktor verfügt über einen Medieneinlass an der Seite (1), über den das Zellmedium von der Antriebseinheit durch die Herzklappe gepumpt wird. Das herzkloppentragende Teflon™-Gerüst wird an Position (2) fixiert und die regelrechte Klappenöffnung über ein Endoskop in der dafür vorgesehenen Halterung (3) kontrolliert. Zwei Ausgleichszylinder (4) sorgen für die Verstärkung des supravulvulären Druckes, welcher sich über die dynamische Trennwand (5) regulieren lässt. Mehrere Luer-Lock-Konnektionen (4+6) dienen zum sterilen Füllen des Bioreaktors mit Medium bei Inbetriebnahme sowie zum Gasaustausch (CO<sub>2</sub>) über sterile Filter während des Betriebs. Über den Auslass (7) fließt das Medium zurück zur Antriebseinheit. Über eine aufschraubbare großzügige Öffnung (8) kann sowohl die herzkloppentragende Teflon™-Halterung steril eingebracht werden, als auch der Bioreaktor bequem mit Medium befüllt werden. Alle Bauteile sind luft- und flüssigkeitsdicht verbunden. Der Gasaustausch erfolgt einzig durch sterile Filter am Dach des Bioreaktors. Die Antriebseinheit besteht aus einem Computer (9), einem Motor (10), und einem hydraulischen Kolben (11), worüber Luftdruck-Impulse an ein Berlin Heart EXCOR® geleitet werden, welches das Zellmedium entsprechend pulsatil antreibt. Maßstabballen A = 50 mm, B = 200 mm.

Bildquelle: Herzchirurgisches Forschungslabor LMU München

Über einen Druckschlauch wird der Luftdruck-Impuls an ein Berlin Heart EXCOR® (Abbildung 3) weitergeleitet. Hier werden die Luftdruck-Impulse über eine Membran in pulsatilen Zellmedium-Fluss umgewandelt. Ventile innerhalb des EXCOR® sorgen für einen gerichteten Fluss. Bei einem maximalen Schlagvolumen der EXCOR®



Pumpeneinheit von 60 ml ergibt sich z.B. bei 80 Schlägen pro Minute ein errechnetes Minutenvolumen von ca. 4,8 l/min.

**Abbildung 3:**



**Abbildung 3: Berlin Heart EXCOR®.** Medium-Einstrom (1), Medium-Ausstrom (2), Druckleitung zur Antriebseinheit (3), und Membran (4) innerhalb der Einheit.

Bildquelle: [www.berlinheart.de/](http://www.berlinheart.de/)

#### **4.4.2 Konditionierungs-Bioreaktor**

Analog zum HFBR wurde der Konditionierungs-Bioreaktor bereits im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe entwickelt und publiziert (EU-Patent ausstehend: EP10166094.2) [58]. Dieser Bioreaktor wurde in Kooperation mit der Technischen Universität München entwickelt. Auch hier wurde in erster Linie angestrebt einen Bioreaktor zu entwickeln, der für Untersuchungen und Entwicklungen im Rahmen des Tissue Engineering eingebrachte Konstrukte pulsatilem Fluss unter physiologischen Bedingungen aussetzen kann. Das Ziel war ein kompaktes System mit niedrigen Flussraten zu entwickeln, um geringe Scherkräfte zu erzeugen, welche schrittweise und kontrolliert erhöht werden können. Dabei sollten eingebrachte Gewebe und Gerüste endoskopisch dokumentiert werden

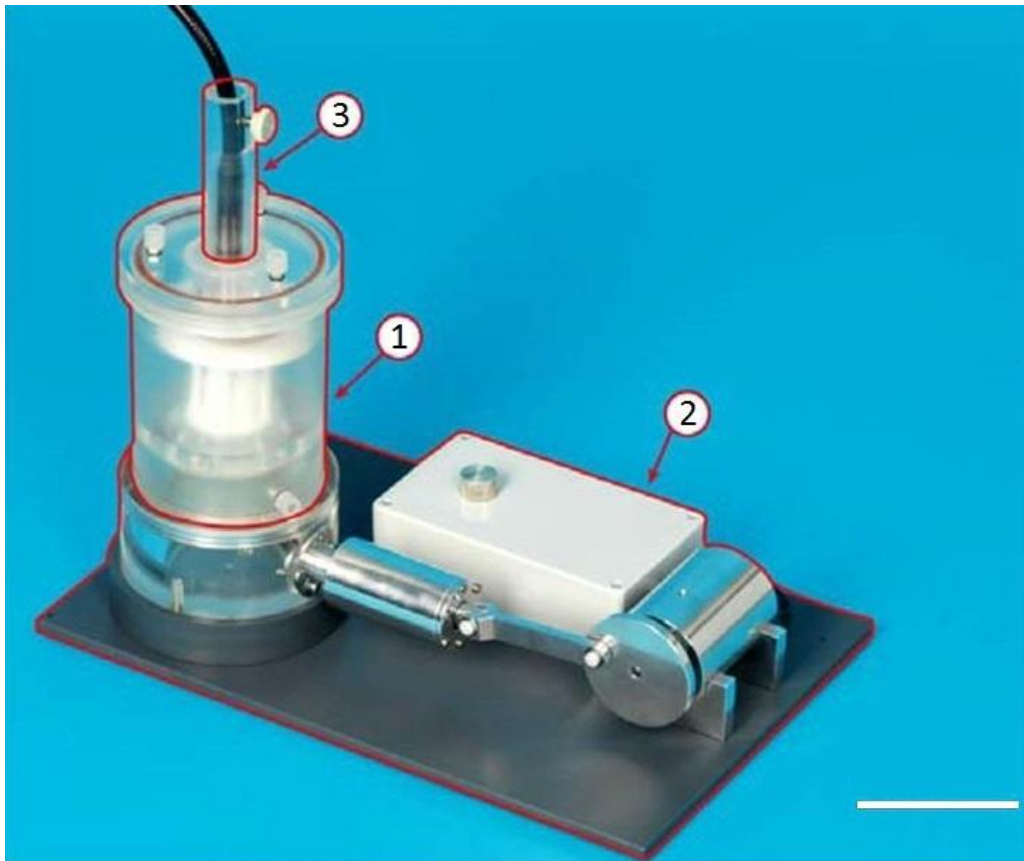
können. Aus Praktikabilitätsgründen und um Anwenderfehler zu minimieren wurde auf einen unkomplizierten Auf- und Abbau der einzelnen Bauteile Wert gelegt. Die Gesamtgröße sollte die Inkubation in einem Standard Brutschrank erlauben. Dieses System wurde aus den Werkstoffen Polymethylmethacrylat (Plexiglas®), Polytetrafluorethylen (Teflon™), Aluminium und Gummi in den Klinikwerkstätten der Universitätsklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München gefertigt. Analog zum HFBR erfolgt der Gasaustausch zur Umgebungsluft über mehrere Sterilfilter in der oberen Abdeckung des Bioreaktors. Vorversuche belegten die anhaltende Sterilität während des Betriebs.

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Bioreaktoren zum Gebrauch für Tissue Engineering beschrieben [53, 59-63]. Viele dieser Bioreaktoren haben den Nachteil einer besonders sperrigen Bauart [64] oder funktionieren mit vielen Schläuchen und Verbindungsstellen [45, 53, 65], was Einschnitte in der Handhabung, wie auch Prädilektionsstellen für Undichtigkeiten mit möglicher Kontamination mit sich bringt. Im Gegensatz dazu zeigt der hier verwendete Konditionierungs-Bioreaktor ein kompaktes und klares Design, welches ohne viele Schrauben und Schläuche auskommt. Aufgrund des kompakten Designs passt der Bioreaktor komplett in einen Standard-Inkubator, wodurch physiologische Bedingungen (37°C / 5 % CO<sub>2</sub>) aufrechterhalten werden können.

Die sog. Kerneinheit (Abbildung 4/1) bietet eine stabile Fixiermöglichkeit für das Herzklappen-tragende Teflon™-Gerüst (Abbildung 1A). Zudem ist die Kerneinheit aus durchsichtigem Acryl-Glas gefertigt, was es erlaubt makroskopisch Prozesse innerhalb des Bioreaktors zu verfolgen. Das Zellmedium wird von unten nach oben durch die Herzklappe gepumpt, sodass sich diese nach oben hin öffnet. Anschließend zirkuliert das Medium an der Außenseite der Herzklappe und deren Halterung nach unten zurück. Von dort wird das Medium erneut durch die Klappe nach oben gepumpt, wodurch ein geschlossener Kreislauf innerhalb des Reservoirs entsteht. Durch die Ventilfunktion der Herzklappe wird eine gerichtete Rezirkulation gewährleistet. Durch ein Luer-Lock-Verbindungssystem an der Basis der Kerneinheit kann sowohl Zellmedium getauscht/erneuert, als auch eine Druckmessung angebracht werden. Über weitere Luer-Lock-Verbindungen am Deckel der Einheit findet über sterile Filter der Gasaustausch (CO<sub>2</sub>) statt. Eine weitere Luer-Lock-Verbindung am Deckel dient dem Zellmedium-Austausch.

Die komplexeste Einheit des Konditionierungs-Bioreaktors ist die Antriebseinheit (Abbildung 4/2). Ein speziell entwickelter Antrieb gewährleistet einen pulsatilem Fluss, der stark genug ist, um beim Aufwärts-Strom innerhalb der Kerneinheit zu einer kompletten Herzklappenöffnung zu führen. Ein Geschwindigkeits-Regulator ist mit dem Motor verbunden, um eine konstante Drehzahl von 0 - 60 Umdrehungen pro Minute zu erzielen. Der Motor ist mit einer Scheibe verbunden, die über eine exzentrisch angebrachte Stange den Kolben antreibt. Der im Zylinder entstehende Luftdruck wird in eine Luftkammer mit Silikon-Membran weitergeleitet. Über die Membran wird verdrängtes Volumen ausgeglichen, was in pulsatilem Zellmediumfluss innerhalb der Kerneinheit resultiert. Durch diese Auf- und Abbewegung der Membran wird Zellmedium nach oben verdrängt. Ein höheres Schlagvolumen als 35,00 cm<sup>3</sup> wurde aufgrund der Gefahr der Membran-Überdehnung nicht angestrebt. Analog zum HFBR erlaubt es die Monitoreinheit (Abbildung 4/3), mittels eines Endoskops die regelrechte Klappenöffnung zu überwachen. Um das Kontaminations- und Infektionsrisiko innerhalb der sterilen Kerneinheit zu minimieren, ist das Endoskop durch eine dünne Glasplatte von der Kerneinheit getrennt. Eine spezielle Endoskophalterung am Deckel der Kerneinheit erlaubt es vorübergehend ein Endoskop zu montieren, ohne den Betrieb des Bioreaktors einzustellen. Wie bei allen anderen Bioreaktoren müssen ebenfalls die Temperatur, die CO<sub>2</sub>-Konzentration und der pH-Wert konstant gehalten werden, um den lebenden Zellen auf den Herzklappen optimale Bedingungen zu bieten. Wie beim HFBR befindet sich der komplette KBR im Versuchsaufbau in einem Standardinkubator. Bei korrekter Funktion des Inkubators mit entsprechendem Inkubator-Monitoring kann auf eine Kontrolle von Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inneren des Bioreaktors verzichtet werden. Anhand eines Farbindikators kann der pH-Wert des Zellmediums abgelesen werden.

**Abbildung 4:**



**Abbildung 4: Aufbau des Konditionierungs-Bioreaktors.** Klappentragende Kerneinheit (1), Antriebseinheit (2), und Monitoreinheit mit Endoskop (3). Maßstabbalken = 100 mm.  
Bildquelle: Herzchirurgisches Forschungslabor LMU München

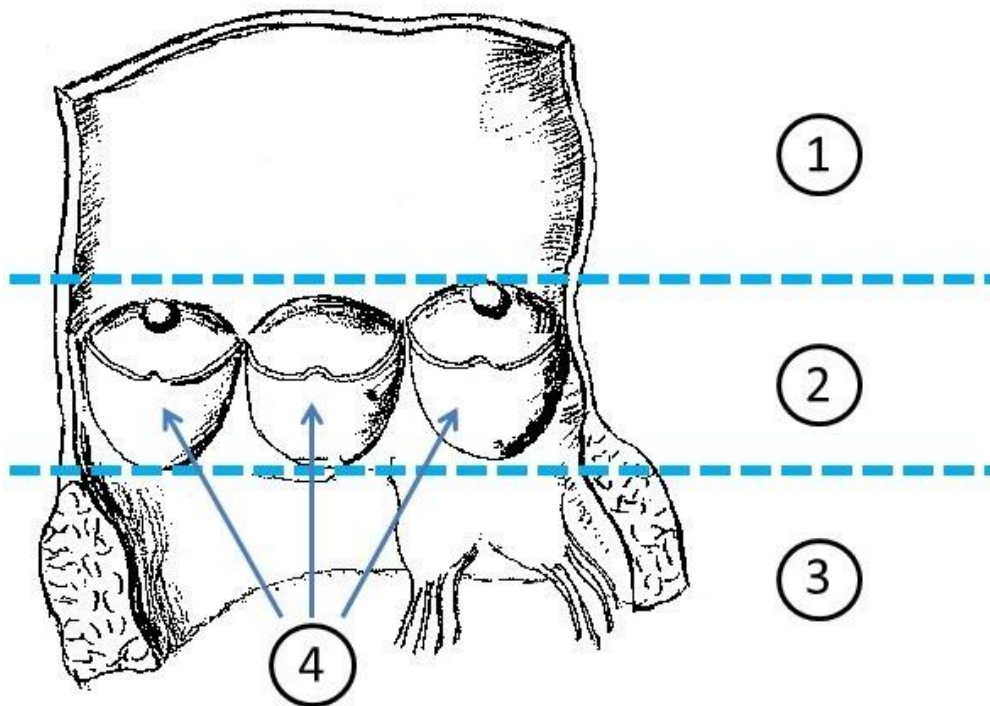
#### **4.5 Analyse**

Zur Untersuchung der Proben wurden Rasterelektronenmikroskopie (REM), Immunhistochemie (IHC), Immunzytochemie (ICC) und real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (rt-PCR) genutzt.

Proben wurden von Zellkulturen, nativen Polyurethanklappengerüsten und den besiedelten Polyurethan-Herzklappen genommen. Proben der besiedelten Polyurethan-Herzklappenwand wurden vor bzw. nach jedem Arbeitsschritt genommen: nach Besiedelung mit FB, nach Besiedelung mit EZ, nach initialer 5-tägiger Perfusion im Konditionierung-Bioreaktor (Gruppe B), nach 3-tägiger Perfusion im highflow-Bioreaktor (Gruppe A + B). Um die Aussagekraft der Untersuchungen zu erhöhen, wurden nach Abschluss der Perfusion im highflow-Bioreaktor Proben der

Herzklappen aus supravulvulären, valvulären und subvalvulären Wandabschnitten, sowie der Klappensegel verarbeitet (Abbildung 5). Um eine regelrechte Klappenfunktion während der Perfusion in den Bioreaktoren zu gewährleisten, wurden Proben der Klappensegel nur am Ende des Perfusionsprotokolls nach highflow-Perfusion entnommen.

**Abbildung 5:**



**Abbildung 5:** Längs eröffneter Aortenbulbus. Schema zur Einteilung der Probenentnahmestellen: supravulvulärer Aortenwandabschnitt (1), valvulärer Aortenwandabschnitt (2), subvalvulärer Aortenwandabschnitt (3) und Klappensegel (4).

Bildquelle: modifiziert entnommen aus [66]

#### **4.5.1 Immuncytochemie**

Analog zur Immunhistochemie (IHC) ist die Immuncytochemie (ICC) eine laborchemische Methode um Proteine oder andere Strukturen mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Zur phenotypischen Charakterisierung der isolierten Zellen wurden eine immuncytochemische und eine morphologische Analyse durchgeführt. EZ wurden aufgrund ihrer pflastersteinartigen Morphologie identifiziert.

FB wurden anhand ihrer charakteristischen elongierten, spindelförmigen Erscheinung mit einigen Fortsätzen erkannt.

Zum immuncytochemischen Nachweis von EZ und FB wurden 100.000 Zellen in 300 µl Medium suspendiert und in einem 8-Kammer-Objektträger (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bis zur Zellkonfluenz kultiviert. Anschließend wurden Färbungen gegen endothelspezifische CD31-Antigene (CD31-Antikörper: 10,25 µg/ml, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und gegen fibroblastenspezifische TE-7-Antigene (TE-7-Antikörper: 2 µg/ml, Millipore Corporation BioScience Division, USA) durchgeführt. Dabei wurde ein HRP Detecting System (Biozol GmbH, Eching, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Die Zellen wurden vorübergehend bei -80 °C in 96%-igem Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Der Färbevorgang wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Spülen mit PBS (phosphate buffered saline; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und Sättigen der endogenen Peroxidasen mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%-ig; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in 200 ml PBS wurden die Zellen mit dem primären Antikörper für 30 min inkubiert. Anschließend wurde mit HRP Streptavidin Label (Biozol GmbH, Eching, Deutschland) für 10 min und AEC-Peroxidase-Substrate (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) für weitere 10 min inkubiert. Eine Gegenfärbung wurde mit Mayer's Hemalaun (20%; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 3 min durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden mittels Hellfeldmikroskopie analysiert.

#### **4.5.2 Immunhistochemie**

Immunhistochemische Färbungen wurden zum Nachweis von FB, EZ und extrazellulären Matrixproteinen sowie interzellulären Verbindungen und inflammatorischen Markern auf den besiedelten Herzklappen durchgeführt. IHC-Untersuchungen von nativen Polyurethan-Herzklappen wurden nicht durchgeführt.

Zum Nachweis der Zellbeschichtung wurde gegen TE-7 (zum Nachweis von FB) und gegen CD31 (zum Nachweis von EZ) gefärbt. Um extrazelluläre Matrix (EZM) darzustellen, wurden Proben gegen die EZM-spezifischen Antigene Collagen IV und

Fibronectin gefärbt. Interzelluläre Verbindungen wurden mit dem Nachweis von Connexin-43, sowie VE-Cadherin gefärbt. Um immunmodulatorische Zellreaktionen zu zeigen, wurden Proben gegen VCAM und ICAM gefärbt. Zum Nachweis bzw. zum Ausschluss von Verunreinigungen durch andere Zellen aus den Venen wurde gegen SMC-Myosin und  $\alpha$ -Actin gefärbt.

Die entnommenen Proben wurden 10 Tage in Formalin (4%, Microcos GmbH, Garching, Deutschland) fixiert und schließlich in Paraffin eingebettet. Aus den ausgehärteten Probenblöcken wurden mit einem Mikrotom 10  $\mu$ m dicke Schnitte aus der Probenmitte entnommen und auf Objektträger aufgebracht. Das Paraffin wurde zweimal je 15 Minuten mit Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) ausgewaschen, gefolgt von einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zur Rehydratation. Verbleibender Alkohol wurde im Anschluss mit aqua destillata ausgewaschen und die Proben mit PBS gepuffert. Die Zellmembranen wurden mit Triton-X (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; 0,5% in PBS) 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert.

Proben, die gegen Fibronectin, SMC-Myosin oder Kollagen IV gefärbt wurden, mussten vorweg einer Proteolyse unterzogen werden. Hierfür wurde Protease (250  $\mu$ g/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in destilliertem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) für 3 min bei Raumtemperatur verwendet. Zur Demaskierung von SMC-Myosin, Connexin-43 und VE-Cadherin wurden die Proben in Target Retrieval Lösung (pH = 6,0; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) gekocht; 7 min Kochen für SMC-Myosin und Connexin-43, 10 min Kochen für VE-Cadherin. Zur Demaskierung von CD31 und  $\alpha$ -Actin wurden die Proben in 10 mM Tris/1 mM EDTA Lösung (pH = 9,0, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gekocht; 15 min für CD31, 10 min für  $\alpha$ -Actin. Die Demaskierung von TE-7, VCAM und ICAM erfolgte durch 10 minütiges Kochen der Proben in 0,1 mM EDTA Lösung (pH = 8,0, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

Nach dem Blockieren der endogenen Peroxidasen mittels 0,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %-ig, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in 200 ml PBS wurden die Proben bei 4 °C über Nacht mit den primären Antikörpern inkubiert. Antikörper gegen folgende Antigene wurden verwendet: VCAM (10  $\mu$ g/ml; Millipore GmbH,

Schwalbach/ Ts., Deutschland), ICAM (50 µg/ml; Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Deutschland), SMC-Myosin (19 µg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), Fibronectin (0,2 µg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), TE-7 (2 µg/ml; Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Deutschland), Connexin-43 (12,5 µg/ml; Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland), VE-Cadherin (10 µg/ml ; Beckmann Coulter Inc., Marseille, Frankreich), Collagen IV (6,75 µg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), CD31 (10,25 µg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und  $\alpha$ -Actin (0,55 µg/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

Anschließend wurden die Proben für 10 min mittels EnVision™ + Dual Link System-HRP (CELLMARQUE, Rocklin, CA, USA) inkubiert, gefolgt von AEC Markierung mittels AEC-Peroxidase-Substrate Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) für 10 min bei Raumtemperatur. Eine Gegenfärbung wurde mit 20%-igem Mayer's Hemalaun (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Als Negativprobe wurden nicht-spezifische Bindungen von biotinylierten Verbindungen durch das Entfernen der primären Antikörper erkannt. Zum Eindecken der Objektträger wurde bei jeder Probe eine äquivalente Menge an Eindeckmedium (Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die Schnitte wurden im Hellfeldmikroskop betrachtet (Leica DMR microscope, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Von allen Proben der Herzklappen wurden mindestens zwei unterschiedliche Schnitte untersucht, dabei wurde jede Probe in mindestens vier Sichtfeldern analysiert.

Die Intensität der immunhistochemischen Färbungen wurde analysiert und als hoch, mittel, niedrig, oder nicht vorhanden klassifiziert.

#### **4.5.3 Rasterelektronenmikroskopie**

Um die Integrität der umhüllenden Zellschichten der besiedelten Zellträger zu beurteilen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Gewebeproben der Aortenwand angefertigt: nach der statischen Besiedelung mit FB und EZ (Gruppe A+B), nach 5 Tagen Konditionierungs-Perfusion im KBR (Gruppe B) und zusätzlich



nach 3 Tagen im HFBR (Gruppe A+B). Als Negativ-Kontrolle wurden die nativen Polyurethan-Herzklappen ebenfalls im REM aufgenommen.

Die Probenvorbereitung erforderte eine Fixierung, Entwässerung, Trocknung und Beschichtung mit leitendem Material (sog. „Sputtern“). Die Fixierung erfolgte für mindestens 48 Stunden bei 4 °C in der Lösung Fix II (456 ml aqua bidest; Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland), 0,75 ml 1-N-Hydrochlordsäure (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 43,5 ml Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 5,65 g Na-CaCO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Anschließend wurden die Proben mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (30 %, 50 %, 70 %, 90 % and 96 %), gefolgt von 99,9 %-igem unvergälltem Ethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Zum Schluss wurden die Proben in reines Aceton (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überführt. Durch die aufsteigende Ethanolreihe wurde das initiale Fixierungsmedium Fix II vollständig durch Aceton ersetzt. Aceton ist essentiell für das anschließende Kritisch-Punkt-Trocknen. Beim Kritisch-Punkt-Trocknen wurde das Aceton schrittweise gegen flüssiges Kohlenstoffdioxid ausgetauscht. Dafür wurde in einem Autoclaven die Kammer mit der Probe zunächst komplett mit Aceton befüllt und anschließend unter Überdruck (ca. 60 bar) in mehreren Schritten durch fluides CO<sub>2</sub> ersetzt. Bis das Aceton vollständig ersetzt wurde, musste dieser Schritt mehrmals wiederholt werden. Im Anschluss wurde die Temperatur in der Probenkammer über den kritischen Punkt des Kohlenstoffdioxids (31 °C) auf ca. 40 °C gebracht und dort gehalten. Danach wurde der Druck langsam über ein Ventil reduziert bis der Umgebungsdruck erreicht war und die getrocknete Probe entnommen werden konnte.

Danach folgte das Beschichten der trockenen Proben, das sog. „Sputtern“. Beim Sputtern wurden die trockenen Proben für 180 Sekunden im Vakuum (10<sup>-5</sup> mbar) mit Gold-Atomen bedampft, wodurch sich eine extrem dünne Goldschicht auf den Probenoberflächen unter der Erhaltung von Oberflächendetails und Oberflächenstrukturen ablagerte. Die Gold-Atome wurden aus einer Goldkathode abgegeben (28 mA; 570 V; Sputter Coater, SCD 50, Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Deutschland). Ein Rasterelektronenmikroskop (Zeiss Evo® LS 10; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) wurde zur Mikroskopie und Dokumentation verwendet, die Bildausgabe erfolgte digital am PC.

#### **4.5.4 Real time Polymerase Ketten Reaktion**

Die Expression signifikanter Gene wurde quantitativ anhand real-time PCR (rt-PCR) untersucht. Bei diesem Verfahren wurde die Menge bzw. Konzentration von intrazellulär vorliegender mRNA nach einer Umschreibung zu cDNA bestimmt. Diese cDNA-Produkte wurden mit Hilfe der Kettenreaktion amplifiziert und das Produkt mit einer Standardkurve eines Transkriptionsproduktes mit konstanter Syntheserate (in unserem Versuch: GAPDH) verglichen, um Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf zu bestimmen. Die rt-PCR-Analyse wurde gemäß dem Hersteller-Protokoll nach der SYBR-Green-Methode durchgeführt [67].

Proben für die PCR-Analyse wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -196 °C gelagert. Zuerst wurde RNA unter Verwendung des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Deutschland) aus den Proben isoliert. Dafür wurden die Zellen bzw. Zellmembranen lysiert und in unterschiedlichen Waschschritten die mRNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Vor der Weiterverarbeitung wurde die Reinheit und Konzentration der mRNA anhand eines Absorptionsspektrometers bestimmt. Die darauf folgende reverse Transkription von genau 700 ng RNA erfolgte gemäß Herstelleranleitung (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Danach wurden das Rotor-Gene Q 2plex System (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und das QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) benutzt, um die Expression von IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM und GAPDH (Quanti- Tect Primer Assay, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zu bestimmen. Zur Optimierung der PCR-Reaktionen sind geeignete Primer-Konzentrationen erforderlich. Bei zu hoher Primer-Konzentration interagieren die Primer untereinander unspezifisch, bei zu niedriger Konzentration ist die Amplifikationsrate niedriger als theoretisch möglich, da das PCR-Reaktionspotential nicht komplett ausgenutzt wird. Zur Bestimmung einer optimalen Primer-Konzentration wurden in einem PCR-Durchgang jeweils fünf Konzentrationen eines Primers gemessen (1:5, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000). Anhand der entstandenen Standardkurven wurde für jeden Primer eine optimale Konzentration definiert. Bei allen PCR-Messungen wurden zusätzlich Negativkontrollen mit Wasser anstelle von Probenmaterial analysiert. Resultierende Ct-Werte aller Ergebnisse wurden im

Verhältnis zu GAPDH bestimmt. GAPDH weist als „Haushaltsgen“ oder „housekeeping gene“ eine gleichbleibende Synthese und folglich Konzentration in der Zelle auf. Zeitliche Abweichungen zu der Syntheseaktivität von GAPDH lassen so Rückschlüsse auf die Expression anderer Parameter zu. Die Spezifität der PCR-Ergebnisse wurde durch die Messung einer Schmelzkurve nach jeder rt-PCR überprüft. Bei der Schmelzkurvenbestimmung wird die Grundtemperatur von 60 °C langsam (1°C pro 10 sec) auf 90 °C erhöht. Während der Erwärmung wird die Fluoreszenz des SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoffs erfasst und im Diagramm gegen die entsprechende Temperatur aufgetragen [67-69]. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurde nach jeder rt-PCR eine Gel-Elektrophorese (FlashGel System, Lonza GmbH, Basel, Schweiz) durchgeführt. Hier ließ man die Proben gegen DNA-Fragmente bekannter Länge in Gel-Kassetten unter Anlage von Strom (175 V) laufen. Die entstandenen Bandenmuster wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotodokumentiert [70].

Zur Erfassung der Cytokin-Expression wurden jeweils Proben aus den Zellkulturen von isolierten FB und EZ untersucht. Proben der mit FB und EZ beschichteten Herzklappen wurden sowohl vor als auch nach der Perfusion im Konditionierungs- und highflow-Bioreaktor entnommen und untersucht.

Analog zu IHC und REM wurden Proben der Herzklappensegel für rt-PCR erst nach Abschluss des Perfusionsschemas analysiert, um eine regelrechte Klappenfunktion im Versuchsablauf zu gewährleisten.

#### **4.6 Statistische Analyse**

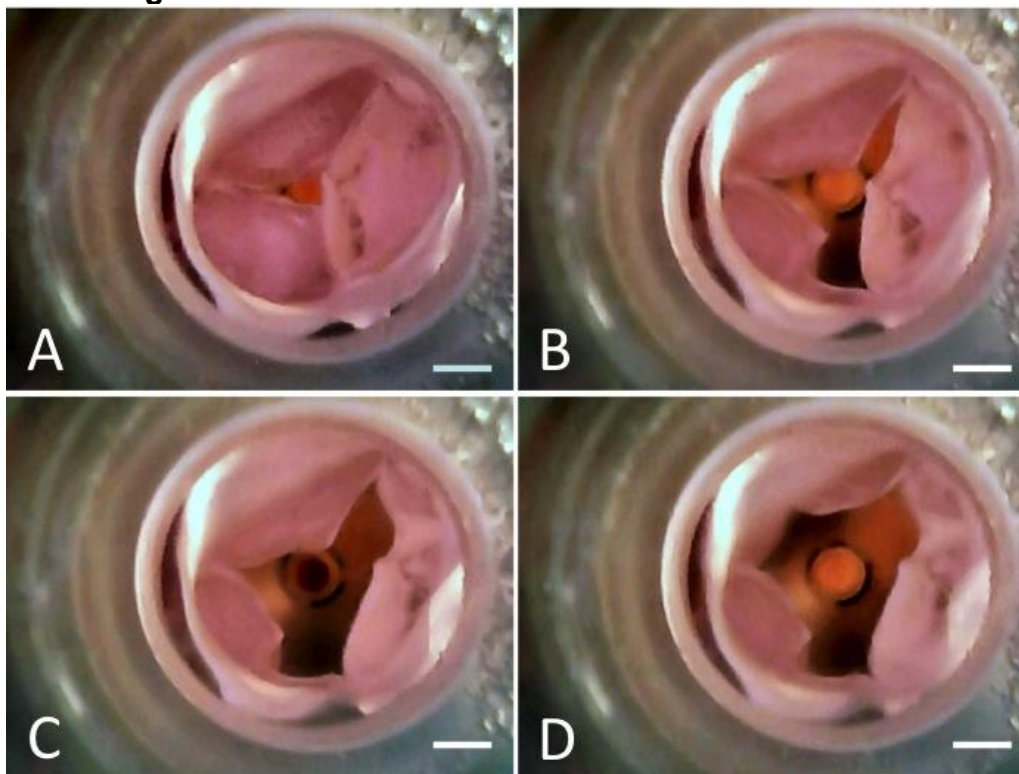
Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein Student's T-Test wurde zum Vergleich von ungepaarten Proben durchgeführt. Der Wahrscheinlichkeitswert  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Videoendoskopische Kontrolle der periodischen Klappenöffnung

Videoendoskopische Aufnahmen sowohl aus dem HFBR als auch aus dem KBR belegten, dass sich die eingebrachten besiedelten Herzklappen im pulsatilem Flüssigkeitsstrom periodisch öffnen und schließen. Die Aufnahmen aus dem KBR und HFBR zeigten bis auf baulich bedingt unterschiedliche Lichtverhältnisse analog gleiche Klappenöffnungszustände. Abbildung 6 zeigt exemplarisch eine Öffnungsphase in der Draufsicht auf eine Klappe.

**Abbildung 6:**



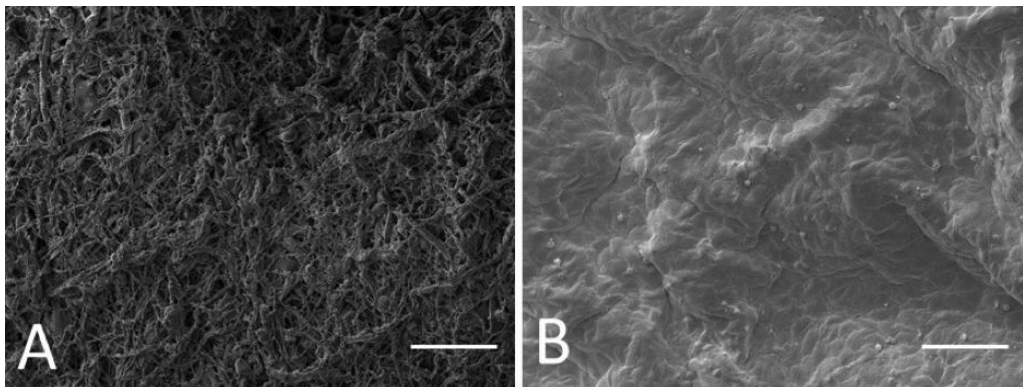
**Abbildung 6: Endoskopische Aufnahme der Klappenöffnung.** Die Ansicht erfolgt gegen die Flussrichtung, Draufsicht von oben. Die Klappe öffnet im pulsatilem Nährmediumstrom von geschlossen (A) kontinuierlich über (B) und (C) bis zur endsystolischen maximalen Öffnung (D). Maßstabbalken = 5 mm  
Bildquelle: Herzchirurgisches Forschungslabor LMU München

## 5.2 Effizienz der Zellbesiedelung

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von nativen Polyurethan-Herzklappen zeigten eine homogene, zufällig verteilte netzartige Anordnung der Polyurethan-Fasern (Abbildung 7A).

Nach der Beschichtung der Polyurethan-Klappen mit FB und EZ im Besiedelungszyylinder wurden Proben aus der Aortenwand entnommen und immunhistochemisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Hier zeigten REM-Aufnahmen eine sehr effektive Kolonisation und eine konfluente Zellschicht (Abbildung 7B). Die Zellen waren gleichmäßig verteilt und mit Ausnahme der Schnittränder konnte man keine Lücken sehen, an denen das darunter liegende Polyurethan-Gerüst frei lag.

**Abbildung 7:**

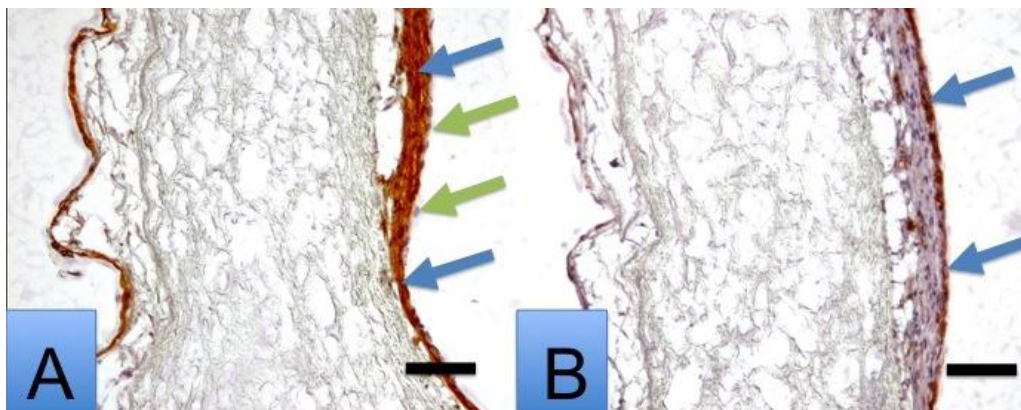


**Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Polyurethan-Herzklappen.** Zufällig angeordnete Polyurethan-Fasern bilden die Oberfläche von unbesiedelten Herzklappengerüsten (A). Eine konfluente Zellschicht wurde nach der Besiedelung mit FB und EZ gesehen (B). Die Abbildungen A und B sind repräsentative Bilder aus unabhängigen Versuchen mit 12 Polyurethan-Herzklappen. Maßstabsbalken: A: 150µm; B: 100µm

Eine immunhistochemische Untersuchung nach Beschichtung mit FB und EZ im Besiedelungszyylinder zeigte über die gesamte Oberfläche der Proben aus der Aortenwand mehrlagig angeordnete Zellen, die sich durch eine Färbung gegen TE-7 anfärben ließen (Abbildung 8A). Stellenweise zeigte sich eine Ablösung der Zelloberfläche vom Polyurethangerüst, was auf die Aufarbeitung beim Färbeprozess zurückzuführen ist. Des Weiteren zeigte die Färbung gegen CD31 eine positive

Reaktion (Abbildung 8B). Dabei war zu erkennen, dass auf allen Oberflächen CD31 positive Zellen auf der Lumen zugewandten Seite oberflächlich exprimiert waren, und sich darunter eine CD31 negative Zellschicht befand, deren äquivalente Abschnitte sich in der Färbung gegen TE-7 deutlich anfärbten.

**Abbildung 8:**



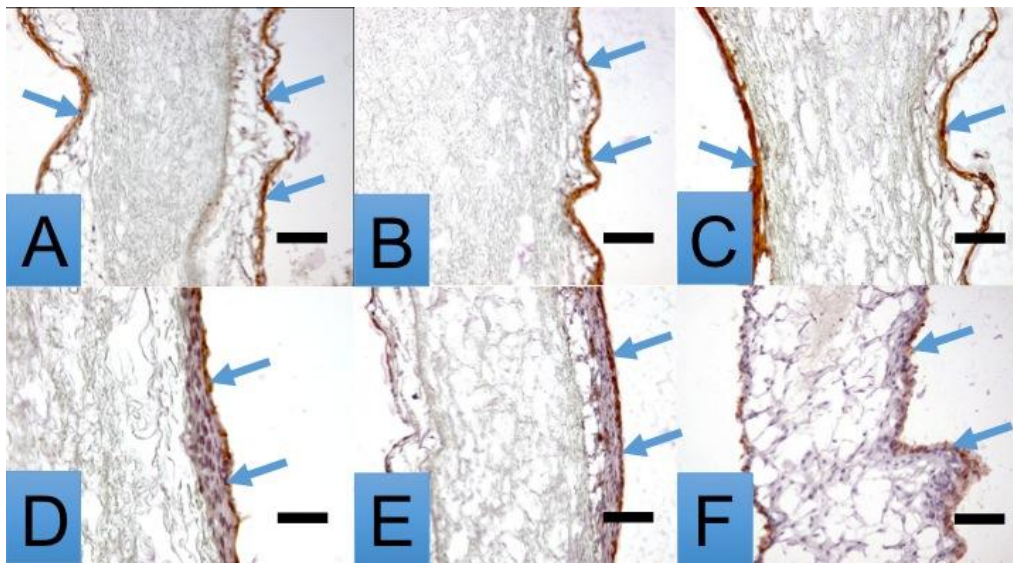
**Abbildung 8: Immunhistochemische Untersuchungen von zellbeschichteten Polyurethan-Herzklappen.** Nach Beschichtung im Besiedelungszyylinder können mittels IHC sowohl TE-7 positive (A; Pfeile), als auch CD31 positive Zellen (B; Pfeile) nachgewiesen werden. Eine mehrlagige TE-7 positive Zellschicht (A; braun; Pfeile) wird von einer TE-7 negativen Zellschicht bedeckt (A; grüne Pfeile). Äquivalente Abschnitte dieser Zellschicht färbten sich in der Färbung gegen CD31 auf allen Oberflächen deutlich an (B; braun; Pfeile). Maßstabbalken: 100  $\mu$ m.

### **5.3 Integrität des Zellüberzuges nach Perfusion**

Nach alleiniger Perfusion im Konditionierungsbioreaktor zeigte sich eine Anlagerung von Zellen auf allen Oberflächen der Herzklappe. Färbungen gegen TE-7 (Abb. 9A) und CD31 (Abb. 9D) identifizierten diese Zellen basal als FB und oberflächlich als EZ. Nach anschließender Perfusion im HFBR blieb diese Beschichtung erhalten. Basal imponierten TE-7 positive Zellen (Abb. 9B), die in äquivalenten Schnitten CD31 negativ erscheinen. Oberflächlich ließ sich eine CD31 positive Zellschicht anfärben (Abb. 9E). Analog dazu zeigte sich nach isolierter highflow-Perfusion eine TE-7 positive Zellschicht (Abb. 9C) unter einer CD31 positiven Zellschicht (Abb. 9F). Die Färbungen in Abbildung 9A und Abbildung 9D zeigen jeweils die Aufarbeitung von Proben der Gruppe B nach einem Zwischenschritt. Nach endgültiger Perfusion

im HFBR konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied in der Intensität der jeweiligen Färbungen im direkten Vergleich zwischen den Gruppen A und B erkannt werden (Abbildung 9B vs. 9C; Abbildung 9E vs. 9F). In beiden Gruppen bleibt eine größtenteils gleichmäßige, konfluente Zellschicht nach erhöhter Flussrate im HFBR erhalten. Die dem Lumen zugewandte Innenseite zeigte eine Konglomeration von dickeren Zellschichten, die aus mehr Zellschichten bestehen als die Außenseite der Herzklappenwand (z.B. Abbildung 9E).

**Abbildung 9:**

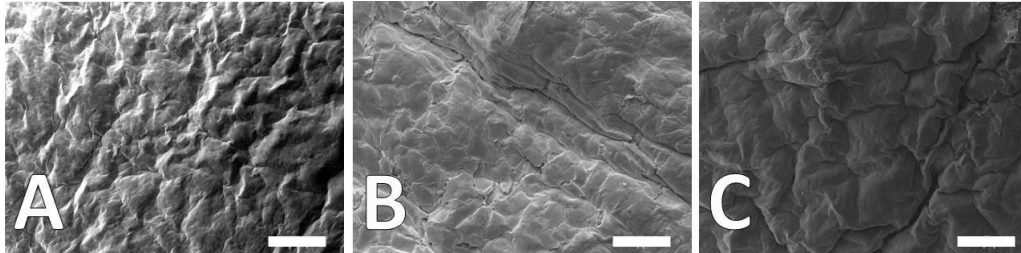


**Abbildung 9: Immunhistochemische Untersuchungen von zellbeschichteten Polyurethan-Herzklappen nach Perfusion in den Bioreaktoren.** Perfusion im KBR allein (A) sowie mit anschließender highflow-Perfusion (B) und auch highflow-Perfusion allein (C) resultierten in der Bildung einer mehrlagigen TE-7-positiven Zellschicht (A-C; braun; Pfeile) bedeckt von einer TE-7-negativen Zellschicht. Verarbeitete Polyurethan-Herzklappen zeigten das Vorhandensein von CD31-positiven Zellen auf allen Oberflächen nach Konditionierungs-Perfusion (D; braun; Pfeile). Analog zeigte sich sowohl nach highflow-Perfusion mit Präkonditionierung (E) als auch nach isolierter highflow-Perfusion (F) eine CD31-positive Zellschicht (braun; Pfeile). Maßstabbalken: 100 µm, D: 50 µm.

Elektronenmikroskopisch zeigten die Oberflächen der Herzklappen beider Gruppen A (Abbildung 10B) und Gruppe B (Abbildung 10C) nach Perfusion in den Bioreaktoren ebenfalls eine konfluente Zellschicht. Zusätzlich zeigten die Proben aus Gruppe B nach der Perfusion im Konditionierungs-Bioreaktor und vor highflow-Perfusion eine geschlossene, konfluente Zelldecke (Abbildung 10A). Ergänzend deutet die typische

Pflasterstein-förmige Morphologie der Zellen darauf hin, dass es sich bei den Zellen der oberflächlichen, lumenseitigen Zellschicht um EZ handelt. Dies gilt für beide Gruppen A und B. An der Innenseite der Herzklappenwand waren die EZ in Flussrichtung orientiert. Dieser Effekt war in Proben der Gruppe B stärker ausgeprägt (Abbildung 10C).

**Abbildung 10:**



**Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Polyurethan-Herzklappen nach Perfusion in den Bioreaktoren.** Die Innenseite der beschichteten Polyurethan-Herzklappen zeigte nach Perfusion in den Bioreaktoren eine konfluente Zelloberfläche mit einer für EZ typischen Pflasterstein-förmigen Morphologie (A-C). Nach isolierter lowflow-Perfusion im KBR war eine gleichmäßige konfluente Zelloberfläche zu sehen (A). Nach der Perfusion im Konditionierungs- und anschließend im highflow-Bioreaktor zeigten die Zellen an der Innenseite der Herzklappenwand eine stärkere Ausrichtung in Flussrichtung (C) als in Gruppe A, nach isolierter highflow-Perfusion (B). Die Abbildungen A-C sind repräsentative Bilder aus unabhängigen Versuchen mit 12 Polyurethan-Herzklappen.

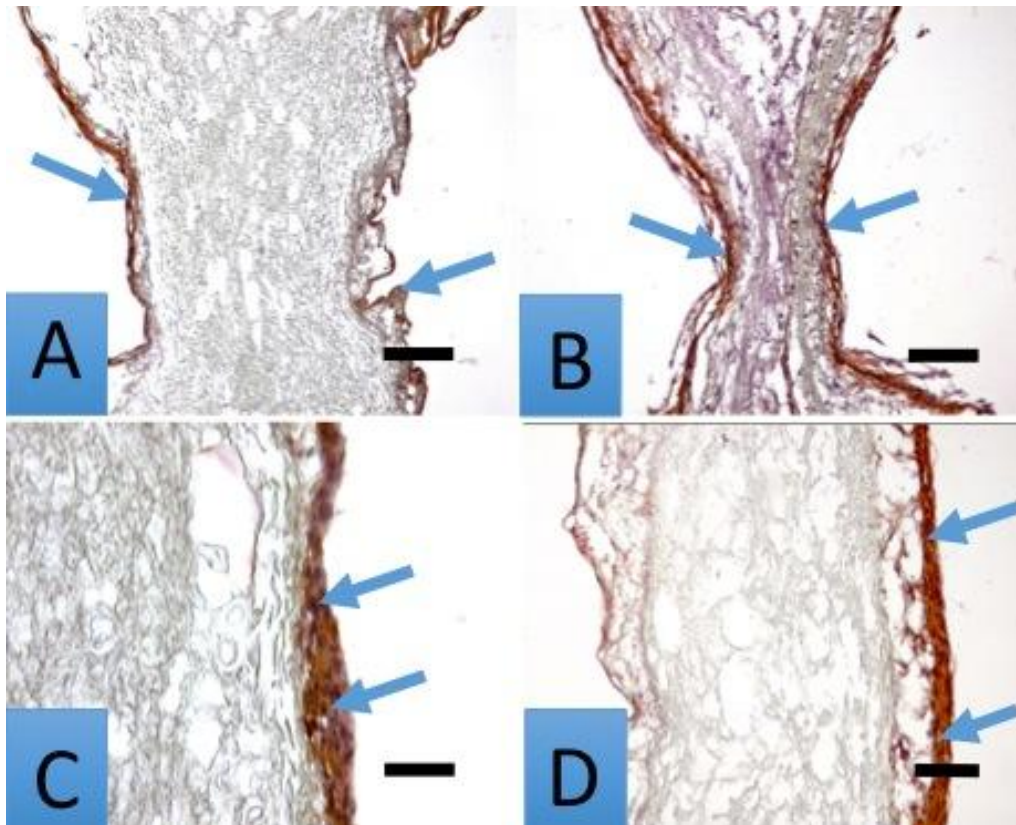
Maßstab: 100µm

#### **5.4 Nachweis von extrazellulären Matrixproteinen**

Die extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV und Fibronectin konnten in einer stärkeren Farbintensität nachgewiesen werden, nachdem die Herzklappen Konditionierungs- und highflow-Perfusion ausgesetzt wurden (Abbildung 11B+D). Nach isolierter highflow-Perfusion im HFBR waren diese Proteine ebenfalls deutlich nachweisbar, jedoch in einer geringeren Intensität (Abbildung 11A+C).



**Abbildung 11:**

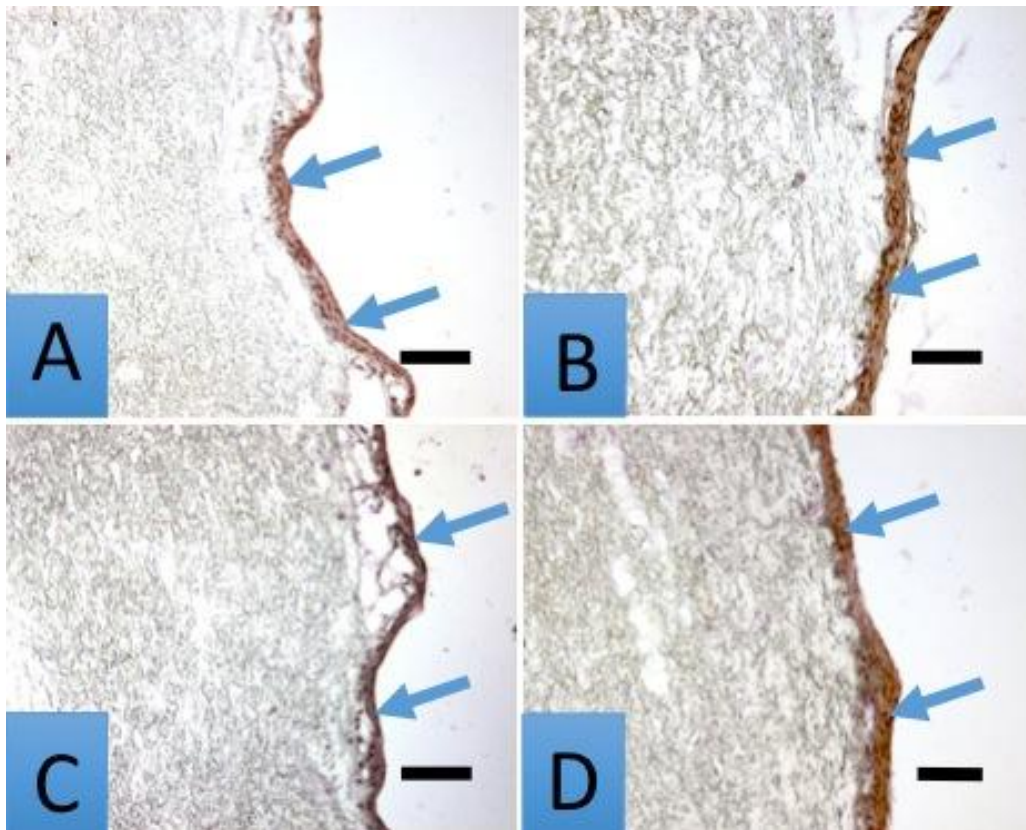


**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen gegen Kollagen IV und Fibronectin.** Die Färbung gegen Kollagen IV (braun; Pfeile) zeigte eine höhere Intensität nach highflow-Perfusion mit Präkonditionierung (B) als nach isolierter Perfusion im HFBR (A). Auch die Intensität der Färbung gegen Fibronectin nach Perfusion mit Präkonditionierung (D) war intensiver als nach highflow-Perfusion allein (C). Maßstabbalken: A, B: 100  $\mu\text{m}$ ; C, D: 50  $\mu\text{m}$

### **5.5 Darstellung von interzellulären Verbindungen**

In beiden Gruppen A und B gelang die Anfärbung von interzellulären Verbindungsproteinen. Die Färbung gegen die interzellulären Verbindungsproteine Connexin-43 und VE-Cadherin konnte nach isolierter highflow-Perfusion (Abbildung 12A+C) in einer niedrigeren Farbtintensität nachgewiesen werden als nach highflow-Perfusion mit vorangegangener Konditionierung (Abbildung 12B+D).

**Abbildung 12:**

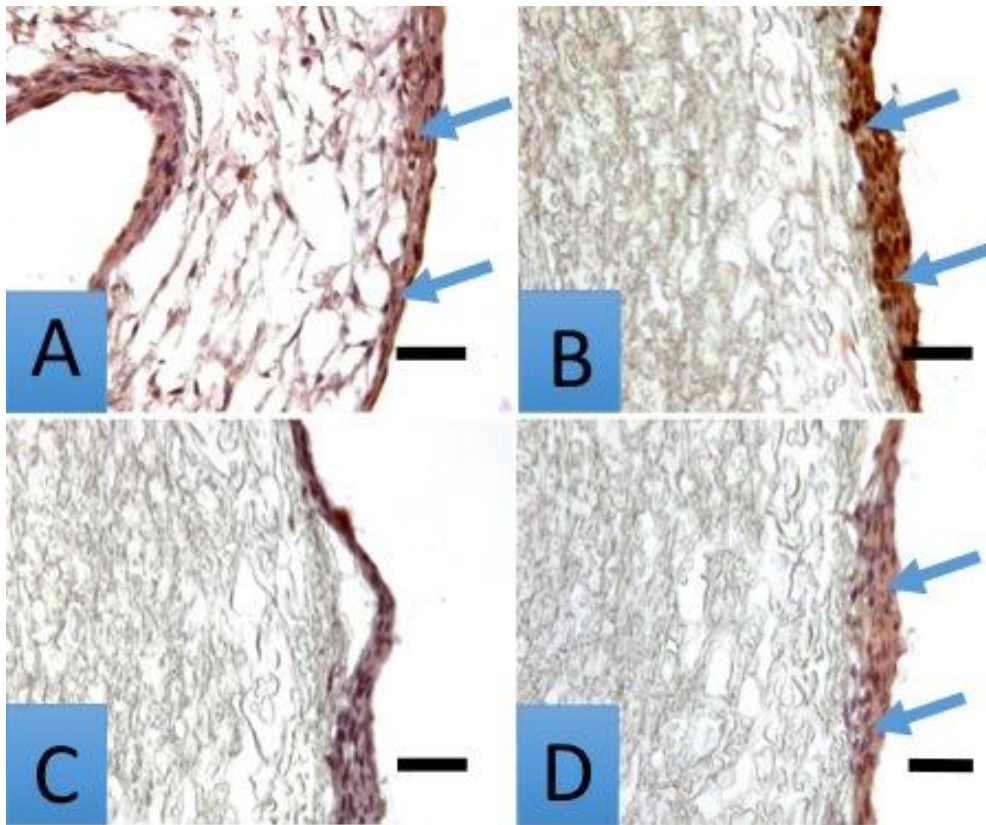


**Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen gegen Connexin-43 und VE-Cadherin.** Proben aus Gruppe A (A) zeigten nach isolierter highflow-Perfusion eine niedrigere Farbintensität der Färbung gegen Connexin-43 (braun; Pfeile) als Proben aus Gruppe B (B). Auch die Färbung gegen VE-Cadherin (braun; Pfeile) war nach highflow-Perfusion mit Präkonditionierung (D) stärker ausgeprägt als nach Perfusion im HFBR allein (C). Maßstabbalken: 100 µm

### **5.6 Färbung immunmodulatorischer Proteine**

In beiden Gruppen A und B konnten immunmodulatorische Proteine nur spärlich nachgewiesen werden. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung zeigte eine niedrigere Expressierung von ICAM nach highflow-Perfusion als nach Konditionierungs- und highflow-Perfusion (Abbildung 13A+B). VCAM war in beiden Gruppen kaum nachzuweisen, jedoch tendenziell niedriger in Gruppe A, nach alleiniger highflow-Perfusion als in Gruppe B mit vorgeschalteter Konditionierung (Abbildung 13C+D).

**Abbildung 13:**



**Abbildung 13: Immunhistochemische Färbungen gegen ICAM und VCAM.** Eine niedrigere Intensität der Färbung gegen ICAM (braun; Pfeile) wurde nach isolierter highflow-Perfusion nachgewiesen (A), als nach highflow-Perfusion mit Präkonditionierung (B). VCAM wurde in beiden Gruppen vernachlässigbar gering nachgewiesen. Die Intensität nach alleiniger highflow-Perfusion (C) war jedoch marginal geringer als nach Konditionierungs- und highflow-Perfusion (D; braun; Pfeile). Maßstabbalken: 100  $\mu$ m

### **5.7 Ausschluss der Verunreinigung durch andere Zelltypen**

Um die Anwesenheit anderer Zelltypen wie z.B. glatter Muskelzellen auszuschließen, wurde gegen SMC-Myosin gefärbt. SMC-Myosin konnte nach der initialen Beschichtung im Besiedelungszyylinder nicht nachgewiesen werden. In beiden Gruppen A und B blieben Färbungen gegen SMC-Myosin immunhistochemisch sowohl nach der Perfusion im KBR (nur Gruppe B) als auch nach der darauffolgenden Perfusion im HFBR negativ (Gruppe A und B; Ergebnisse nicht abgebildet).

## **5.8 Cytokin-Expression und rt-PCR**

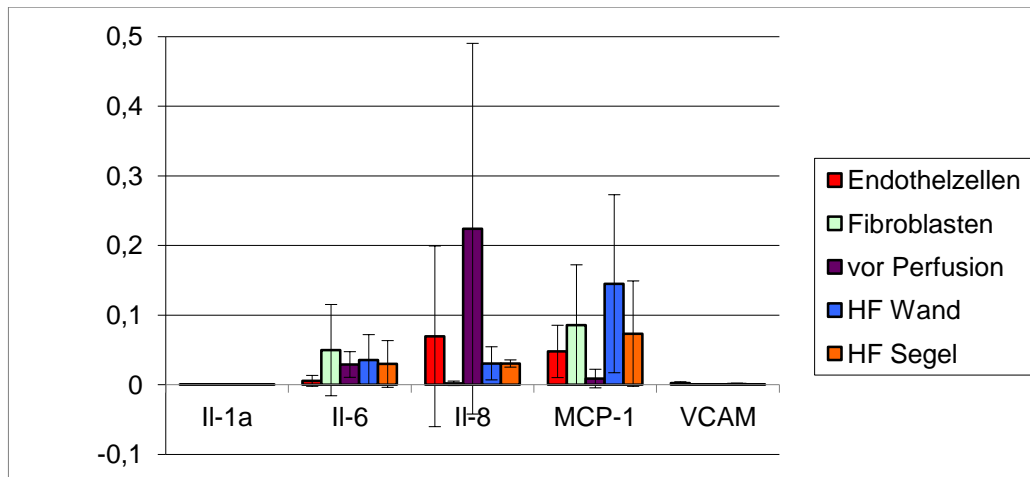
Das „housekeeping“-Gen GAPDH wurde als Referenzwert verwendet, um die Expression von IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM zu quantifizieren. Es wurden Proben von allen Herzklappen aus drei unterschiedlichen, fest definierten Bereichen der Aortenwand und aus den Klappensegeln entnommen. Aus allen Proben wurde die Genexpression für oben genannten Cytokine bestimmt. Die Analyse der Proben der Aortenwand zeigte jeweils nur geringe Unterschiede zwischen den drei Bereichen. Der Übersichtlichkeit halber wurden die rt-PCR Ergebnisse der Proben der Aortenwand zu einem Mittelwert aus dem subvalvulärem, valvulärem und supra-valvulärem Wert zusammengefasst.

### **5.8.1 Cytokin-Expression vor Perfusion in den Bioreaktoren**

Nach Isolation und Kultivierung der FB und EZ Kulturen wurden Proben aus jeder Zellkultur entnommen und mittels rt-PCR analysiert. Im Anschluss wurden die restlichen Zellen der Kultur verwendet um die PU-Klappe im Besiedelungszyylinder zu beschichten. Abbildung 14 zeigt Mittelwerte der rt-PCR Ergebnisse aller FB Kulturen (Abb. 14; hellgrün) und EZ Kulturen (Abb. 14; rot). Nach Isolation und Kultivierung war eine deutliche Genexpression für IL-6 bei FB und IL-8 bei EZ zu bemerken. Eine MCP-1 Genexpression wurde zu diesem Zeitpunkt sowohl in FB als auch in EZ Kulturen eindeutig nachgewiesen. Auffällig war hier, dass IL-6 in FB Zellkulturen mindestens 1,6-fach stärker exprimiert wurde als nach jedem darauffolgendem Arbeitsschritt in Gruppe A (siehe Anhang: rt-PCR-Tabellen; Abb. 14). In EZ Kulturen wurde IL-8 sogar in einer mindestens 2,3-fach höheren Konzentration nachgewiesen als nach Perfusion in den Bioreaktoren in Gruppe A und B (siehe Anhang: rt-PCR-Tabellen; Abbildungen 14+15).

Nach Beschichtung der Herzklappen mit FB und EZ im Besiedelungszyylinder wurde eine massive Genexpression für IL-8 festgestellt (Abb. 14; lila). Nach Perfusion im HFBR sank dieser Wert jedoch um 85 % (Abb. 14; siehe Anhang: rt-PCR-Tabellen).

**Abbildung 14:**



**Abbildung 14: rt-PCR-Resultate der Zellkulturen und der Proben aus Gruppe A.** Nach Isolation und Kultivierung der FB (hellgrün) und EZ (rot) war eine deutliche Genexpression für IL-6, IL-8 und MCP-1 zu erkennen. Auffällig war die höhere Expression von IL-8 in der EZ Kultur, verglichen mit den Werten nach Perfusion im HFBR (Wand: blau; Segel: orange). Nach Beschichtung im Besiedelungszyylinder (lila) wurde vor allem IL-6 und IL-8 exprimiert, wobei die Genexpression von IL-8 nach dem weiteren Prozeptionsschritt, der Perfusion im HFBR, deutlich niedriger war. Perfusion im HFBR resultierte vor allem in einem Anstieg der MCP-1 Genexpression. Die Genexpression für IL-1a und VCAM war vernachlässigbar gering. Die Ergebnisse für EZ und FB sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der jeweils 12 verwendeten EZ und FB Kulturen. Alle anderen Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten der Gruppe A angegeben.

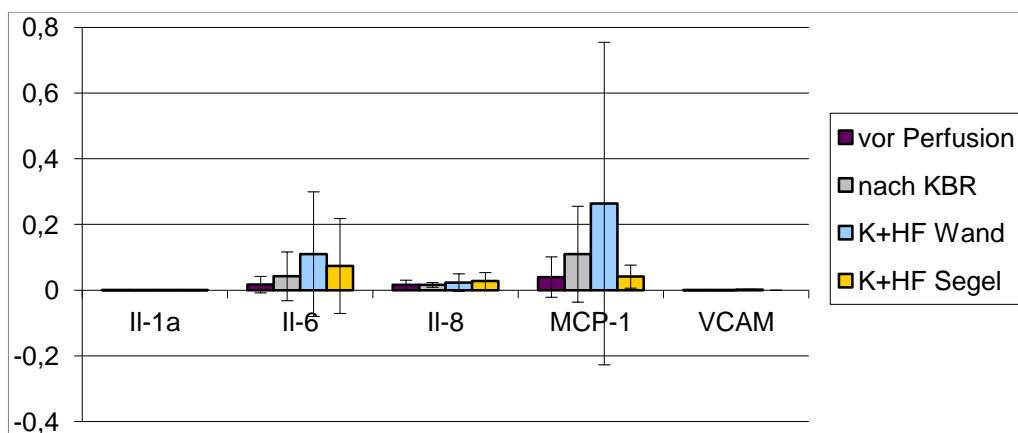
In beiden Gruppen war die Expression von IL-1a und VCAM sowohl in den Zellkulturen als auch nach Beschichtung im Besiedelungszyylinder und nach Perfusion in den Bioreaktoren unbedeutend gering. Eine Aussage zur Expressions-Veränderung in Abhängigkeit zu einem Arbeitsschritt konnte somit nicht gemacht werden.

### **5.8.2 Cytokin-Expression nach Perfusion in den Bioreaktoren**

Aus Herzklappen der Gruppe B konnten zusätzlich nach Perfusion im KBR (vor Perfusion im HFBR) Proben aus der Aortenwand entnommen werden. Im Vergleich zu im Zylinder beschichteten Herzklappen (Abb. 15; lila) zeigte sich nach

Präkonditionierung (Abb. 15; grau) eine höhere Genexpression für IL-6 und MCP-1. Der darauffolgende Perfusionsschritt im HFBR resultierte in einer weiteren Steigerung der Expression dieser Cytokine (Abb. 15; hellblau). Die Genexpression für IL-6 und MCP-1 aus den Proben der Segel fiel deutlich geringer aus, jedoch lagen für Proben aus den Segeln keine Vorwerte zu den äquivalent vorangegangenen Arbeitsschritten vor. Eine Genexpression für IL-8 konnte nach Präkonditionierung nur schwach nachgewiesen werden, IL-1a und VCAM wurden wie bereits erläutert nur vernachlässigbar gering exprimiert.

**Abbildung 15:**

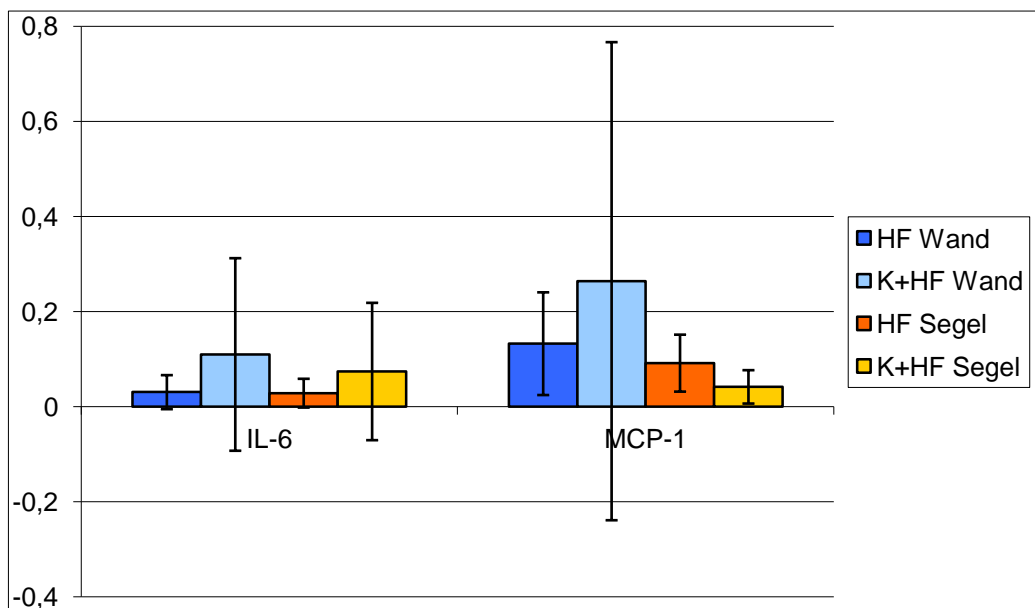


**Abbildung 15: rt-PCR-Resultate der Proben aus Gruppe B.** Analog zum zeitlichen Verlauf der Arbeitsschritte war ein deutlicher Anstieg der Genexpression von IL-6 und MCP-1 zu vermerken. Nach der Beschichtung im Besiedelungszyylinder (lila) wurden Gene für IL-6, IL-8 und MCP-1 exprimiert. Eine deutliche Änderung der Genexpression für IL-6 und MCP-1 war vor allem nach Perfusion im KBR (grau) mit weiterer Steigerung nach Perfusion im HFBR (hellblau) zu sehen. Die Segel wurden erst nach Abschluss des Perfusionsschemas analysiert, um eine regelrechte Klappenfunktion im Versuchsablauf zu erhalten. Die Genexpression für IL-1a und VCAM war vernachlässigbar gering. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten der Gruppe B angegeben.

Abbildung 16 zeigt eine Übersicht über die Mittelwerte der Genexpressionen von IL-6 und MCP-1 am Ende der jeweiligen Perfusions-Schemata von Gruppe A und B. Hier werden die Genexpressionen in der Aortenwand und in den Klappensegeln nach Abschluss der Perfusion der besiedelten Herzklappen gezeigt. IL-1a, IL-8 und VCAM wurden nur gering exprimiert. Ihre statistische Auswertung ergab keine signifikanten

Werte ( $p$  wesentlich größer als 0,05). Daher wird an dieser Stelle auf eine grafische Darstellung für IL-1a, IL-8 und VCAM verzichtet (tabellarische Werte: siehe Anhang). Im direkten Vergleich der Endergebnisse zeigte die jeweilige Expression gemessener Cytokine eine höhere Konzentration nach Konditionierung mit anschließendem highflow-Perfusions-Regime (Gruppe B), als nach highflow-Perfusion alleine (Gruppe A): vergleicht man Gruppe A und B zeigt der Einfluss von Präkonditionierung eine signifikante Erhöhung der Expression von IL-6 an den Klappensegeln ( $p < 0,001$ ) sowie den Trend einer Erhöhung der Expression von MCP-1 an den Klappensegeln ( $p \approx 0,1$ ) (Abbildung 16; tabellarische Werte: siehe Anhang). Quantitativ ist eine deutliche Erhöhung der Expression von IL-6 und MCP-1 an der Aortenwand nach Perfusion mit Präkonditionierung festzustellen, jedoch ohne relevantes Signifikanzniveau ( $p = 0,37$  für IL-6,  $p = 0,54$  für MCP-1).

**Abbildung 16:**



**Abbildung 16: Mittelwerte der rt-PCR-Resultate von IL-6 und MCP-1 nach Perfusion in den Bioreaktoren:** Das Säulendiagramm zeigt die Expression von Cytokinen, die aus Herzklappen am Ende von zwei unterschiedlichen Versuchs-Protokollen analysiert wurden: Perfusion im HFBR und Perfusion im HFBR mit Präkonditionierung. Die pro-inflammatorischen Cytokine IL-6 und MCP-1 wiesen eine höhere Expression nach Konditionierungs- mit anschließender highflow-Perfusion auf. Die Genexpression der Cytokine wurde auf die Expression des „housekeeping-genes“ GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten in jeder Gruppe angegeben. HF: highflow-Perfusion (Gruppe A), K+HF: Konditionierungs- und highflow-Perfusion (Gruppe B).

## **6. Diskussion**

Trotz der rasanten Entwicklung und Einführung von minimalinvasiven Ansätzen zur Behandlung von hochgradigen Herzklappenerkrankungen ist der operative Herzklappenersatz nach wie vor die vorherrschende Therapie [71, 72]. Obwohl mechanische Klappenprothesen exzellente Haltbarkeit ohne Degeneration bieten, beinhalten sie ein hohes Risiko für thromb-embolische Ereignisse und benötigen daher lebenslange Antikoagulation. Diese lebenslange Antikoagulation ist mit einem Risiko für schwere und konsequenzenreiche Blutungskomplikationen vergesellschaftet. Vor allem innere Blutungen ohne primär sichtbaren Blutverlust stellen eine große Gefahr dar und können unter Antikoagulation schnell lebensgefährlich werden [3-5, 73-75].

Der größte Vorteil von biologischen Herzklappen (sowie von Homografts) ist, dass nach ihrer Implantation keine lebenslange Antikoagulation benötigt wird. Die Nachteile von biologischen Herzklappenprothesen sind jedoch offensichtlich: vor allem limitierte Haltbarkeit, vorzeitige Verkalkung (v.a. bei Homograft-Implantationen), die fehlende Möglichkeit des Wachstums und der Regeneration sowie das limitierte Angebot an Spender-Organen schränken ihre Anwendung vor allem bei pädiatrischen Patienten und jungen Erwachsenen stark ein [6-8]. Tissue Engineering von Herzklappenprothesen könnte diese Nachteile beseitigen.

Bei unserer Wahl des Trägermaterials für das Klappengerüst wurden sowohl biologische als auch synthetische Alternativen berücksichtigt. Arbeiten anderer Autoren zeigten bereits mehrfach die Verwendung von dezellularisierten Herzklappen als biologischen Zellträger, z.B. dezellularisierte Homografts oder dezellularisierte Xenografts. Dabei konnten bereits vielversprechende Ergebnisse für die in-vivo Verwendung von Homografts gewonnen werden [76-78]. Die Verwendung von Xenografts konnte sich hier jedoch nicht behaupten [79]. Trotz der Vorteile und dem vorhandenen Potential von Homografts als geeignetes Trägermaterial verblieb als Ausschlusskriterium für die Planung dieser Arbeit jedoch die streng limitierte Verfügbarkeit von Homografts.

Durch die Verwendung synthetischer Werkstoffe können die Probleme der reduzierten Verfügbarkeit umgangen werden. Bei der Verwendung synthetischer



Materialien für Herzklappengerüste können zwei unterschiedlichen Materialtypen unterschieden werden: resorbierbare Materialien (z.B. Polyglykolsäure, Polyhydroxyalkanoat oder Polylactid-co-Glycolid) oder nicht-resorbierbare Materialien (z.B. Polyurethan). Beide wurden bereits mehrfach in experimentellen und klinischen Ansätzen zur Herstellung tissue-engineerter Herzklappen erprobt. Aufgrund der starken mechanischen Belastung in Aortenklappen-Position und der im Verhältnis fehlenden strukturellen Stabilität von resorbierbaren Trägermaterialien wurden zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Gewebe-Stabilität bisher nur in Pulmonalisklappen-Position bei Tieren (z.B. Schafen) gezeigt [17, 23]. Eine Verwendung resorbierbarer Materialien schien in der Planung unserer Arbeit also nicht zielführend zu sein. Im Gegensatz dazu zeigt das synthetische nicht-resorbierbare Material Polyurethan eine geeignete Haltbarkeit und Belastbarkeit. Zur Verwendung von Polyurethan in der Medizintechnik liegen bereits jahrelange Erfahrungswerte vor [80]. Natürlich zeigt auch Polyurethan in tissue engineernten Konstrukten Verschleißerscheinungen. Langzeituntersuchungen zeigten jedoch ein Abnutzungsverhalten, welches biologischen Werkstoffen nicht unterlegen war [81, 82]. In Zusammenschau o.g. Argumente entschieden wir uns für Polyurethan als Trägermaterial für die Herzklappengerüste. Im Rahmen der Fertigung der Klappengerüste wurden Polyurethan-Fasern im Sprühverfahren aufgetragen, was sowohl Poren im Material als auch eine Kollagenfasern-imitierende Oberfläche mit zufälliger Ausrichtung der Fasern ergab. Eine zuverlässige Zellbesiedelung konnte bereits mehrfach durch eine Kollagenfasern-imitierende Oberfläche belegt werden [25, 26, 83]. Prinzipiell ist eine primäre Herausforderung in der Entwicklung von tissue engineernten kardio-vaskulären Konstrukten die Formation einer konfluenten Endothelzell-Schicht, welche zur Beschichtung von Oberflächen im Blutstrom essentiell ist und dabei diverse wichtige Funktionen erfüllt: von Barrierefunktion, über Ernährung, bis hin zu immunmodulatorischen Aufgaben [51, 52]. Dabei überrascht es nicht, dass das Fehlen eines intakten Endothels zu Komplikationen nach der Implantation von arteriellen Grafts führt [84]. Um die gewünschte Adhäsion von Zellen auf künstlichen Oberflächen von Herzklappen- und Gefäßprothesen zu verbessern sowie die Widerstandskraft gegen Scherkräfte zu erhöhen, haben *Consigny et. al.* künstliche Oberflächen mit unterschiedlichen extra-zellulären Matrixproteinen vorbeschichtet [52]. Einerseits wurde durch diese

Beschichtungsmethode eine bessere Zelladhäsion erreicht, andererseits wurde die Integrität der Zellschicht bei Perfusion mit hohen Flußraten kompromittiert [85], was die Reaktion der angesiedelten Zellen auf Bedingungen mit hohen Scherkräften und hohem Scherstress abbildete.

Wie eingangs erläutert wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche unterschiedliche Zellquellen für das Tissue Engineering von Herzklappen verwendet, ohne jedoch zu einer Empfehlung für die optimale Zellquelle zu gelangen. Als vielversprechende multipotente Zellquellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung, Transformation und Regeneration erwiesen sich Stammzellen fetalen Ursprungs und Stammzellen aus dem Knochenmark [28]. Breymann et al. konnten eine exzellente Wachstumskapazität und die Formation einer Neomatrix bei der Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurblut für kardiovaskuläre TE Konstrukte (große Gefäße und Herzklappen) zeigen [86]. Embryonale Stammzellen sind jedoch für den Großteil zukünftiger praxisorientierter Therapieansätze unbrauchbar. Das ergibt sich aus dem Umstand, dass die meisten Herzklappenersatz-Operationen nach degenerativen Veränderungen im fortgeschrittenen Alter der Patienten durchgeführt werden [10]. In der Regel liegen bei diesem Patientenkollektiv keine körpereigenen embryonalen Stammzellen vor.

*Hoerstrup et al.* publizierten eine in-vitro Analyse tissue engineerter Herzklappen, wobei resorbierbares synthetisches Trägermaterial mit humanen Stammzellen aus dem Knochenmark besiedelt wurde [87]. Daran anknüpfend wurde im Jahr 2011 die erste transapikale Implantation einer tissue engineerter Herzklappe mit autologen Stammzellen aus dem Knochenmark auf einem resorbierbarem Klappengerüst in Aortenklappenposition von *Emmert et al.* beschrieben [88]. In der Planung für unsere Arbeit scheiterte die Verwendung von Stammzellen aus dem Knochenmark jedoch an der Gewinnbarkeit der Zellen und wurde nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurden in unserer Arbeit adulte, ausdifferenzierte Endothelzellen und Fibroblasten aus humanen Vena saphena magna Segmenten verwendet. Die Eignung von Vena saphena magna Segmenten als Zellquelle für TE Konstrukte wurde bereits mehrfach belegt [25, 26, 28, 29, 41]. Um die Adhäsion von EZ zu verbessern, wurde in unserem Labor die Strategie verfolgt, künstliche Oberflächen von Prothesen zuerst mit FB zu besiedeln. Immunhistochemisch war in unserem Versuchsaufbau zu erkennen, dass auf allen Oberflächen der Herzklappen CD31

positive Zellen auf der Lumen zugewandten Seite oberflächlich exprimiert waren, wodurch die Anwesenheit von EZ belegt wurde. Unter dieser Endothelzellschicht befand sich eine CD31 negative Zellschicht, deren äquivalente Abschnitte sich in der Färbung gegen TE-7 deutlich anfärbten. Damit wurde die im Versuchsaufbau gewünschte Konstellation von einer basalen Schicht an FB, auf der sich die EZ ansiedeln, eindeutig nachgewiesen. Dadurch wurden in-vivo-Bedingungen simuliert, indem interstitielle Zellen zur Verfügung standen, die extrazelluläre Matrix regenerieren können und dazu beitragen, die Klappenstruktur aufrechtzuerhalten, wie bereits beschrieben wurde [56].

Darüber hinaus ist die Simulation physiologischer Bedingungen, wie Scherstress, elektrischer und biochemischer Einflüsse und Reize essentiell für die Entwicklung von tissue engineerter Konstruktionen [89]. Um diese Ziele zu erreichen, wurden speziell im kardiovaskulären Tissue Engineering unterschiedlichste experimentelle Ansätze entwickelt. Obligatorisch hierfür sind entsprechende Bioreaktoren, die kontrolliertes Wachstum und Differenzierung von Zellen auf biologischen [90-92] oder artifiziellen Herzklappengerüsten [87, 93-97] ermöglichen bzw. unter standardisierten Bedingungen überwachen.

In unserem Experiment wurde der Effekt der Kultivierung von tissue engineerter Herzklappen unter der Verwendung von zwei unterschiedlichen pulsatilem Bioreaktorsystemen getestet. *Aleksieva et al.* konnten bereits die Überlegenheit von dynamischer Kultivierung in dem verwendeten pulsatilem Bioreaktor gegenüber statischer Kultivierung von tissue engineerter Herzklappen zeigen. Dabei wurden die Formation von extrazellulärer Matrix und die Ausprägung und Homogenität der Zellschichten auf den Klappengerüsten beurteilt [25]. Diesen Gedanken fortführend wollten wir demonstrieren, dass sogar noch höherer Scherstress die Integrität der Zelloberfläche von besiedelten Polyurethan-Herzklappen nicht beeinträchtigt. Letztendlich erwarten wir dadurch eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von tissue engineerter Herzklappen. Ein in unserem Labor entwickelter, innovativer highflow-Bioreaktor bietet die Möglichkeit, Scherkräfte, mechanische Reize und Stimuli in-vitro auf zellbesiedelte Herzklappen auszuüben, um dadurch die Zellproliferation zu verbessern. Das Perfusionsprotokoll sieht in unserem Versuchsaufbau unterschiedlich lange Perfusionszeiten in den Gruppen A und B vor: Gruppe B durchläuft äquivalent die Arbeitsschritte von Gruppe A, mit einer

zusätzlichen Präkonditionierungs-Perfusion von 5 Tagen. Diese unterschiedliche Perfusionsdauer bleibt ein offener Diskussionspunkt. Präkonditionierung wurde als Tool vor einer highflow-Perfusion eingesetzt. Eine weitere Anpassung der highflow-Perfusion, um die vollständige Perfusionsdauer zwischen den beiden Gruppen anzugleichen, würde zu Verzerrungen der Ergebnisse führen.

Die unterschiedlich lange Perfusion in unserem Versuchsaufbau zeigte in beiden Gruppen A und B zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich einer konfluierenden intakten Zellbeschichtung und Besiedelung der Polyurethan-Herzklappen. Besonders stark war diese Zellproliferation an der dem pulsatilem Fluss ausgesetzten Innenseite der Herzklappen ausgeprägt, jedoch ohne wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In Gruppe B zeigte sich jedoch eine stärker ausgeprägte Ausrichtung der EZ in Flussrichtung, was ebenfalls ein Hinweis auf die Adaptation an Scherstress ist [98]. Ein Versuchsaufbau mit Präkonditionierung wurde unter anderem von *Lee et al.* 2009 beschrieben [53]. Hier wurde mit sehr niedrigen Flussraten unter 0,5 L/min begonnen und die Flussrate langsam gesteigert. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen (mit Flussraten von mindestens 1 L/min) waren nach 3 Tagen wesentliche Lücken in der Zellschicht mittels REM und IHC zu bemerken.

Neben der Integrität der Zelloberfläche mit Beurteilung der *Quantität* der Zellschicht, war die *Qualität* der Zellschicht mit Ausbildung einer EZM ein weiteres Untersuchungsgebiet dieser Arbeit. In unserem Versuchsaufbau zeigten immunhistochemische Untersuchungen eine deutliche Produktion von extrazellulärer Matrix in beiden Gruppen. Die Vorteile einer zusätzlichen Konditionierungs-Perfusion vor highflow-Perfusion sind offensichtlich: die Expression von extrazellulärer Matrix inkl. Kollagen steigt an, was zu einer dichteren Formation von zellverbindenden Molekülen führt, was wiederum eine höhere Stabilität der Zellschichten zur Folge hat [8]. *Ramaswamy et al.* beschrieben 2010 eine deutliche Produktion von Kollagenen bei der Kultivierung von TE-Herzklappen unter Bedingungen, die der Pulmonalisklappe in-vivo ähnlich waren [99]. In unserem Versuchsaufbau wurde Kollagen in vergleichsweise niedrigerer Intensität nachgewiesen, jedoch wurden Herzklappen bei *Rawaswamy et al.* über sechs Wochen kultiviert. In unserem Versuchsaufbau wurde insbesondere die vermehrte Expression von Collagen IV, VE-Cadherin und Fibronectin nach highflow-Perfusion mit Präkonditionierung festgestellt.

Wie bereits zuvor erwähnt ist eine ausreichende Formation von extrazellulärer Matrix außerordentlich wichtig für die Morphogenese, Instandhaltung und Rekonstruktion von Gewebe. Zusätzlich wird dadurch aufbauendem Gewebe die Möglichkeit zur Remodellierung gegeben [100].

Die Analyse der rt-PCR Ergebnisse zeigte, dass Präkonditionierung in einem Anstieg der Expression von pro-inflammatorischen Genen resultiert, z.B. MCP-1, was ebenfalls für das Langzeit-Remodelling von tissue engineerten Konstruktionen nötig sein kann [100, 101]. Die stärkere Expression von Cytokinen als Resultat aus der Kombination von Konditionierungs- und highflow-Perfusion bleibt jedoch ein wichtiger Diskussionspunkt. Diese Cytokine und / oder Chemokine spielen Schlüsselrollen in der Mediation von inflammatorischen Reaktionen [102], vor allem MCP-1 und IL-8, welche wichtige Modulatoren in der Monozyten-Endothelzellen Interaktion unter Flussbedingungen sind [103]. Zusätzlich konnten *McGill et. al.* und *Rainwater et. al.* eine Korrelation zwischen der Expression von IL-8 und der Neigung zu Koagulation und Arteriosklerose belegen [104, 105]. Davon geht man auch bei der Monozyten-Aktivierung aus, gefolgt von Adhäsion und Transmigration durch die Endothelzell-Barriere [104, 105]. Neben seinen pro-inflammatorischen Eigenschaften wird IL-8 ebenfalls eine Rolle als pro-proliferatives, pro-angiogenetisches und anti-apoptotisches Cytokin zugeschrieben [106, 107].

In unserem Versuch wurde IL-8 im Gegensatz zu den anderen Cytokinen in der Analyse von zwei individuellen Herzklappen nach alleiniger highflow Perfusion stärker exprimiert, als nach Konditionierungs- und highflow Perfusion. Die übrigen Proben zeigten eine höhere Genexpressionsrate nach Perfusion inklusive Präkonditionierung.

Analog zu den Ergebnissen von *McHale et al.*, *Murui et al.*, und *Aleksieva et al.* zeigte die Analyse unserer zellbesiedelten Herzklappen ebenfalls vernachlässigbar geringe Expressionen von IL-1a und VCAM, sowohl nach highflow-Perfusion als auch nach highflow-Perfusion mit präkonditionierender lowflow-Perfusion [25, 108, 109]. Diese niedrige Expression von IL-1a und VCAM stellt einen beachtlichen Hinweis auf ein niedrigeres Risiko für inflammatorische Reaktionen und Arteriosklerose in beiden Gruppen A und B dar [108, 109].

MCP-1 und IL-6 konnten in der Analyse aller Herzklappen nach Konditionierung mit anschließender highflow-Perfusion in einer größeren Menge nachgewiesen werden

als in der Analyse der Herzklappen nach isolierter highflow-Perfusion. Unabhängig davon fiel der bemerkenswerte Effekt auf, dass MCP-1, IL-6 und IL-8 bereits vor Perfusion in den Bioreaktoren in hohen Maßen exprimiert wurden. Dies führt zu der Annahme, dass nicht nur Scherkräfte und mechanische Reize und Stimulation während der Perfusion, sondern bereits der Vorgang der Zellisolation von Biopsien der Herzklappen Stress-Symptome provozieren können. *Bottino et. al.* beschrieben eine erhöhte Produktion und Expression von MCP-1, IL-6 und IL-8 nach der Zellisolation aus Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas [110]. In dieser Studie wurde die Aktivierung von nukleären Faktor- $\kappa$ B-abhängigen Reaktionen gezeigt, unter anderem die Produktion und Freisetzung von MCP-1, IL-6 und IL-8. Das Auftreten dieser Vorgänge konnte bereits während des Isolations-Prozesses in isolierten, reinen Zellinseln gezeigt werden [110]. Trotzdem konnten keine eindeutigen Informationen gewonnen werden, welche die beteiligten Mechanismen an der Entstehung von Zellschäden erklären. Daher konnten keine Schlussfolgerungen bezüglich Möglichkeiten zur schonenderen Zellisolation getroffen werden. Um inflammatorische Reaktionen zu reduzieren, wird infolgedessen der nächste Schritt sein, dass man sanftere und schonendere Zellisoliationsverfahren entwickelt. Ursächlich sind die erhöhten Cytokin-Genexpressionen vor Perfusion im Bioreaktor in unserer Arbeit dem Vorgang der Zellisolation und Kultivierung zuzuschreiben. *Aleksieva et al.* postulierten Langzeit-Konditionierung von besiedelten Polyurethan-Herzklappen als mögliches Verfahren, um zukünftig eine bessere Zelladaptation an Scherkräfte und stimulierende Reize zu bewirken. Anhand dieses Verfahrens soll die inflammatorische Reaktion nach der Zellisolation und nach der Kultivierung reduziert werden [25].

Letztendlich scheint es am allerwichtigsten zu sein, die kritische Balance zu finden zwischen dem Aussetzen der Zellen gegenüber genügend Scherstress und mechanischen Reizen, um eine adäquate mechanische Stimulation mit entsprechender Bildung von extrazellulärer Matrix zu provozieren. Andererseits führt eine Exposition der Zellen gegenüber zu großen Reizen und Stimuli über Scherstress zu einer unerwünschten erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen. In unserem Versuchsaufbau konnte in beiden Gruppen eine gleichmäßige, konfluente Zellschicht nachgewiesen werden. Die Ausbildung extrazellulärer Matrixproteine sowie interzellulärer Verbindungen profitierte jedoch von einer

Präkonditionierung im KBR. Für weiterführende Experimente, z.B. inklusive Langzeitperfusion, oder zur Vorbereitung von Herzklappen für in-vivo Versuche kann eine Präkonditionierung empfohlen werden. Weiterführende Experimente werden in Zukunft unter anderem die Rolle von pro-inflammatorischen Cytokinen während der Zellkultivierung in Bioreaktoren beleuchten. Auch die weitere Untersuchung der variablen Einflussgrößen und der dem Tissue Engineering zugrunde liegenden Prozesse werden es ermöglichen, die erfolgreiche klinische Anwendung von tissue engineerter Herzklappen zu etablieren.

## **7. Zusammenfassung**

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wir anhand der Versuchsreihe mit je 6 Tissue-Engineerten Herzklappen pro Gruppe zeigen konnten, dass eine vorgeschaltete Konditionierungs-Perfusion vor highflow-Perfusion im Bioreaktor in einem Anstieg der Expression pro-inflammatorischer Cytokine resultiert. Einige dieser Cytokine können für die Langzeit-Remodellierung von tissue engineerten Konstruktionen notwendig sein (z.B. MCP-1) im Gegensatz dazu ist ein allzu erhöhter Pegel an pro-inflammatorischen Cytokinen mit Zellschädigung und Immunreaktion mit z.T. Monozyten-Interaktion assoziiert.

Ein weiteres Ergebnis unserer Studie ist, dass highflow-Perfusion keinen negativen Effekt auf die Integrität der Zellschicht von besiedelten Polyurethan-Herzklappen hat. Sowohl bei Klappen, die vorher im Konditionierungs-Bioreaktor niedrigen Flussraten ausgesetzt wurden, als auch bei Klappen, die nicht präkonditioniert wurden. Der highflow-Bioreaktor stellt also eine Methode dar, um die Reaktion der Zellen auf tissue engineerten Konstruktionen gegenüber Scherstress zu verbessern. Dadurch können mechanische Eigenschaften und die Belastbarkeit von tissue engineerten kardiovaskulären Prothesen optimiert werden. Es ist klar, dass tissue engineerte Herzklappen ab dem Zeitpunkt der in-vivo Implantation unter physiologischen Level von Dehnung, Beugung und Scherkräften funktionieren müssen. Im Gegensatz dazu sind die optimalen Größenordnungen dieser Belastungen in-vitro noch nicht vollständig beschrieben.

Nach unserer Versuchsreihe kann eine Präkonditionierung für weiterführende Versuche empfohlen werden. Abgesehen von positiven Effekten des Präkonditionierens, z.B. der Formation von extrazellulärer Matrix und einer konfluenten Zellschicht, ist der Langzeit-Effekt von erhöhten Cytokin-Spiegeln auf die Zellen nach Präkonditionierung immer noch nicht gänzlich geklärt und verbleibt ein interessantes Forschungsthema.



## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Bonow RO, Carabello BA, Kanu C, de Leon AC, Jr., Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Nishimura R, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 2006;114:e84-231.
- [2] Schoen FJ. In: Silver MD GA, Schoen FJ. *Cardiovascular Pathology*. New York: NY: WB Saunders, 2001.
- [3] Campos NL, Andrade RR, Silva MA. Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010;25:457-465.
- [4] Etienne PY, Papadatos S, El Khoury E, Pieters D, Price J, Glineur D. Transaortic transcatheter aortic valve implantation with the Edwards SAPIEN valve: feasibility, technical considerations, and clinical advantages. *The Annals of thoracic surgery* 2011;92:746-748.
- [5] Bloomfield P. Choice of heart valve prosthesis. *Heart* 2002;87:583-589.
- [6] Dalrymple-Hay MJ, Pearce RK, Dawkins S, Alexiou C, Haw MP, Livesey SA, Monro JL. Mid-term results with 1,503 CarboMedics mechanical valve implants. *The Journal of heart valve disease* 2000;9:389-395.
- [7] Keogh BEK, R. . Fifth National Adult Cardiac Surgical Database Report. Bournemouth, UK: Dendrite Clinical Systems Ltd, 2004:1–352.
- [8] Huang G, Rahimtoola SH. Prosthetic heart valve. *Circulation* 2011;123:2602-2605.
- [9] Hoffmann G, Lutter G, Cremer J. Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:143-148.
- [10] Grunkemeier GL, Li HH, Naftel DC, Starr A, Rahimtoola SH. Long-term performance of heart valve prostheses. *Curr Probl Cardiol* 2000;25:73-154.
- [11] Mayer JE, Jr. *Grundlagen des Tissue Engineering*. Medizintechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2009:373-386.
- [12] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
- [13] Vacanti C. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2006;1:569-576.
- [14] Chmiel H. *Bioreaktoren*. Bioprozesstechnik 2011. Heidelberg, GER: Spectrum Akademischer Verlag, 2011:197-236.
- [15] Chen HC, Hu YC. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology letters* 2006;28:1415-1423.
- [16] Teebken OE, Wilhelmi M, Haverich A. [Tissue engineering for heart valves and vascular grafts]. *Chirurg* 2005;76:453-466.
- [17] Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Annals of biomedical engineering* 2006;34:1799-1819.
- [18] Akhyari P, Minol P, Assmann A, Barth M, Kamiya H, Lichtenberg A. [Tissue engineering of heart valves]. *Chirurg* 2011;82:311-318.
- [19] Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. In vivo tissue engineering: Part I. Concept genesis and guidelines for its realization. *J Biomater Appl* 1999;14:192-209.
- [20] Rabkin E, Schoen FJ. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2002;11:305-317.

- [21] Dohmen PM, Konertz W. Tissue-engineered heart valve scaffolds. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009;15:362-367.
- [22] Schopka S, Schmid FX, Hirt S, Birnbaum DE, Schmid C, Lehle K. Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: in vitro hemocompatibility assessment. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2009;88:130-138.
- [23] Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 2000;102:III22-29.
- [24] Schaefermeier PK, Szymanski D, Weiss F, Fu P, Lueth T, Schmitz C, Meiser BM, Reichart B, Sodian R. Design and fabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering of human heart valves. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 2009;42:49-53.
- [25] 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. *Biomed Eng Online* 2012;11:92.
- [26] Thierfelder N, Koenig F, Bombien R, Fano C, Reichart B, Wintermantel E, Schmitz C, Akra B. In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning. *ASAIO journal* 2013;59:309-316.
- [27] Wintermantel E. *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Berlin, Germany: Springer Berlin, 2009.
- [28] Schaefermeier PK, Cabeza N, Besser JC, Lohse P, Daebritz SH, Schmitz C, Reichart B, Sodian R. Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells. *ASAIO journal* 2009;55:86-92.
- [29] Schmidt D, Hoerstrup SP. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly* 2006;136:618-623.
- [30] Sodian R, Lueders C, Kraemer L, Kuebler W, Shakibaei M, Reichart B, Daebritz S, Hetzer R. Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells. *The Annals of thoracic surgery* 2006;81:2207-2216.
- [31] Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J Am Coll Surg* 2003;196:592-597.
- [32] Kaviani A, Perry TE, Barnes CM, Oh JT, Ziegler MM, Fishman SJ, Fauza DO. The placenta as a cell source in fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 2002;37:995-999; discussion 995-999.
- [33] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:1886-1892.
- [34] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- [35] Nieminen O, Nordstrom K, Kurki P. Tissue engineering: viable technologies seeking regulation -- a Finnish perspective. *Drug Discov Today* 2004;9:387-391.
- [36] McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001;414:129-131.
- [37] Helmy KY, Patel SA, Silverio K, Pliner L, Rameshwar P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv* 2010;1:693-705.
- [38] Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H. DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. *PLoS One* 2011;6:e26052.
- [39] Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 2011;145:875-889.
- [40] Breuer S, Preuner S, Fritsch G, Daxberger H, Koenig M, Poetschger U, Lawitschka A, Peters C, Mann G, Lion T, Matthes-Martin S. 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* 2012;26:509-519.

- [41] Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager JF, Grunenfelder J, Suter A, Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 2001;49:221-225.
- [42] Antranikian G. *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2006.
- [43] Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, Martin I. Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009;112:1-27.
- [44] Minuth W. Mikroreaktortechnik für Tissue Engineering. In: Wintermantel E, editor. *Medizintechnik*. Berlin, Heidelberg, GER: Springer, 2009:387-402.
- [45] Bilodeau K, Mantovani D. Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue engineering* 2006;12:2367-2383.
- [46] Berry JL, Steen JA, Koudy Williams J, Jordan JE, Atala A, Yoo JJ. Bioreactors for development of tissue engineered heart valves. *Annals of biomedical engineering* 2010;38:3272-3279.
- [47] Brown MA, Iyer RK, Radisic M. Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Prog* 2008;24:907-920.
- [48] Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue engineering* 2005;11:1832-1839.
- [49] Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue engineering* 2002;8:863-870.
- [50] Stamm C, Steinhoff G. [Cardiac tissue engineering]. *Herz* 2002;27:445-452.
- [51] 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.
- [52] Consigny PM, Vitali NJ. Resistance of freshly adherent endothelial cells to detachment by shear stress is matrix and time dependent. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:479-485.
- [53] Lee DJ, Steen J, Jordan JE, Kincaid EH, Kon ND, Atala A, Berry J, Yoo JJ. Endothelialization of heart valve matrix using a computer-assisted pulsatile bioreactor. *Tissue Eng Part A* 2009;15:807-814.
- [54] Fischlein T, Lehner G, Lante W, Fittkau M, Murphy JG, Weinhold C, Reichart B. Endothelialization of cardiac valve bioprotheses. *Int J Artif Organs* 1994;17:345-352.
- [55] Haegerstrand A, Gillis C, Bengtsson L. Serial cultivation of adult human endothelium from the great saphenous vein. *Journal of vascular surgery* 1992;16:280-285.
- [56] Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Meiser B, Reichart B. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2003;125:592-601.
- [57] Gulbins H, Pritisanac A, Uhlig A, Goldemund A, Meiser BM, Reichart B, Daebritz S. Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini-roots: development of a seeding device and procedure. *The Annals of thoracic surgery* 2005;79:2119-2126.
- [58] König F, Hollweck T, Pfeifer S, Reichart B, Wintermantel E, Hagl C, Akra B. A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization. *Journal of Functional Biomaterials* 2012;3:480-496.
- [59] Bjork JW, Tranquillo RT. Transmural flow bioreactor for vascular tissue engineering. *Biotechnology and bioengineering* 2009;104:1197-1206.
- [60] Goldstein AS, Christ G. Functional tissue engineering requires bioreactor strategies. *Tissue Eng Part A* 2009;15:739-740.
- [61] Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of bioscience and bioengineering* 2005;100:235-245.
- [62] Sodian R, Lemke T, Loebe M, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Meyer R, Hetzer R. New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches. *J Biomed Mater Res* 2001;58:401-405.

- [63] Zaucha MT, Raykin J, Wan W, Gauvin R, Auger FA, Germain L, Michaels TE, Gleason RL, Jr. A novel cylindrical biaxial computer-controlled bioreactor and biomechanical testing device for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15:3331-3340.
- [64] Vismara R, Soncini M, Talo G, Dainese L, Guarino A, Redaelli A, Fiore GB. A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts. *Annals of biomedical engineering* 2010;38:100-108.
- [65] Z. N. Review of research in cardiovascular devices. In: Verdonck P, editor. *Advances in Biomedical Engineering*. Oxford, UK: Elsevier, 2009:1-59.
- [66] Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*: Elsevier, 2006.
- [67] Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e103.
- [68] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
- [69] Mullis KB. *The polymerase chain reaction*. Boston: Birkhäuser, 1994.
- [70] Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160.
- [71] Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM, 3rd, Thomas JD. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;129:e521-643.
- [72] Mangner N, Schuler G. [ESC guidelines on the management of valvular heart disease. What has changed and what is new?]. *Herz* 2013;38:828-837.
- [73] Beyer-Westendorf J. [Bleeding complications under oral anticoagulation]. *Dtsch Med Wochenschr* 2014;139:2491-2493.
- [74] Poli D, Antonucci E, Lombardi A, Boddi V, Gensini GF, Abbate R, Prisco D. Low rate of bleeding and thrombotic complications of oral anticoagulant therapy independent of age in the real-practice of an anticoagulation clinic. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:269-275.
- [75] Howard PK. Complications associated with oral anticoagulation therapy. *Adv Emerg Nurs J* 2013;35:283-286.
- [76] da Costa FD, Costa AC, Prestes R, Domanski AC, Balbi EM, Ferreira AD, Lopes SV. The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *The Annals of thoracic surgery* 2010;90:1854-1860.
- [77] Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, Aubin H, Tschierschke R, Hoffmann S, Karck M, Lichtenberg A. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;38:539-546.
- [78] Baraki H, Tudorache I, Braun M, Hoffer K, Gorler A, Lichtenberg A, Bara C, Calistru A, Brandes G, Hewicker-Trautwein M, Hilfiker A, Haverich A, Cebotari S. Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials* 2009;30:6240-6246.
- [79] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:1002-1006; discussion 1006.
- [80] Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 1999;14:67-90.
- [81] Grasl C, Bergmeister H, Stoiber M, Schima H, Weigel G. Electrospun polyurethane vascular grafts: in vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:716-723.
- [82] Janik H, Marzec M. A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;48:586-591.

- [83] Gulbins H, Pritisanac A, Dauner M, Petzold R, Goldemund A, Doser M, Meiser B, Reichart B. Seeding of human vascular cells onto small diameter polyurethane vascular grafts. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 2006;54:102-107.
- [84] 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. *The Annals of thoracic surgery* 2006;81:47-55.
- [85] Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2005;74:570-581.
- [86] Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2006;2:87-92.
- [87] Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002;106:1143-150.
- [88] Emmert MY, Weber B, Behr L, Frauenfelder T, Brokopp CE, Grunenfelder J, Falk V, Hoerstrup SP. Transapical aortic implantation of autologous marrow stromal cell-based tissue-engineered heart valves: first experiences in the systemic circulation. *JACC Cardiovasc Interv* 2011;4:822-823.
- [89] 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.
- [90] Flanagan TC, Cornelissen C, Koch S, Tschoeke B, Sachweh JS, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning. *Biomaterials* 2007;28:3388-3397.
- [91] Karim N, Golz K, Bader A. The cardiovascular tissue-reactor: a novel device for the engineering of heart valves. *Artif Organs* 2006;30:809-814.
- [92] Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoeffler K, Hurscheler C, Brandes G, Hilfiker A, Haverich A. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials* 2006;27:4221-4229.
- [93] Engelmayer GC, Jr., Hildebrand DK, Sutherland FW, Mayer JE, Jr., Sacks MS. A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:2523-2532.
- [94] Engelmayer GC, Jr., Rabkin E, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE, Jr., Sacks MS. The independent role of cyclic flexure in the early in vitro development of an engineered heart valve tissue. *Biomaterials* 2005;26:175-187.
- [95] Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE, Jr. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 2000;102:III44-49.
- [96] 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. *Annals of biomedical engineering* 2005;33:1778-1788.
- [97] Schmidt D, Mol A, Breyman C, Achermann J, Odermatt B, Gossi M, Neuenschwander S, Pretre R, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors. *Circulation* 2006;114:1125-131.
- [98] Fuster V AR, O'Rourke RA. *The Heart*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2004.
- [99] Ramaswamy S, Gottlieb D, Engelmayer GC, Jr., Aikawa E, Schmidt DE, Gaitan-Leon DM, Sales VL, Mayer JE, Jr., 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.
- [100] Simionescu A, Schulte JB, Fercana G, Simionescu DT. Inflammation in cardiovascular tissue engineering: the challenge to a promise: a minireview. *Int J Inflam* 2011;2011:958247.
- [101] Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, Stewart-Akers AM. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A* 2008;14:1835-1842.

- [102] Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997;2:d12-26.
- [103] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398:718-723.
- [104] McGill SN, Ahmed NA, Christou NV. Endothelial cells: role in infection and inflammation. *World journal of surgery* 1998;22:171-178.
- [105] Rainwater DL, Shi Q, Mahaney MC, Hodara V, Vandeberg JL, Wang XL. Genetic regulation of endothelial inflammatory responses in baboons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1628-1633.
- [106] 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* 2003;170:3369-3376.
- [107] Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Luger N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003;278:8508-8515.
- [108] McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Immunol* 1999;163:3993-4000.
- [109] 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.
- [110] 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.

## 9. Anhang

### 9.1 Materialien

**Tabelle 9-1: Zellisolation, Kultivierung und Perfusion:**

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Art.-Nr.</u>
Bottle Top Filter 0,2 µm	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark	595-4520
Cell culture flask 75,162 cm <sup>2</sup>	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	3290, 3151
Cell culture flask, 12.5 cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	353107
Collagenase Type 2 CLS-2 (253 U/mg)	Worthington Biochemical Corporation / CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland	4176
Cryo Tube vials	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland	375418
Dimethyl Sulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D5879
Skalpell, Gr. 20	Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, Japan	02.001.30.020
Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-22010
Fibroblast Growth Medium + Supplement Mix	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-23010
Gentamicin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	15750-037
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	G4004
HCl (1N)	Pharmacy, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland	L0306

Heparin 25000 I.E. / 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	126/317126/0403
Human serum albumin 20%	ZLB Behring, Bern, Switzerland	00257/709
Luer slip syringe (20 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	300296
Medium 199 Earle	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	F0665
Millex-GS filter unit (0.22 µm)	Millipore Corporation, MA, USA	SLGSO33SS
Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	16494C
Na-CaCo	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	20838
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	L1825
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P4458
Perfusion Tube Set, Custom Product	Medos Medizintechnik AG, Stolberg, Deutschland	MEH82396
Plain Drape, Secu-Drape	Sengewald, clinic innovations, Rohrdorf-Thansau, Deutschland	504572
Plastic Screw Cup Storage Bottle, 500 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	8393
Serological Pipettes 1, 2, 5, 10, 25 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	4485, 4486, 4487, 4488, 4489
Surgical Gloves sterile	Semperit GmbH, Vienna, Austria	822751805
Suture (3/0)	Resorba, Nuernberg, Deutschland	91513
Syringe Filter (0.2 µm)	Nalgene, Rochester, NY, USA	19-2520
Transfer Pipette 3.5 ml	Sarstedt AG & Co., Nuembrecht, Deutschland	86.1171.001
Trypanblau Solution 0.4%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T8154



Trypsin – EDTA solution (10x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T4174
Knopfkanüle	Medtronic GmbH, Meerbusch, Deutschland	30004

**Tabelle 9-2: Rasterelektronenmikroskopie:**

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Art.-Nr.</u>
Acetone for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00014.5000
Ethanol 30, 50, 70 und 96%	Pharmacy, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland	.....
Specimen stubs, 12,5 mm	Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Deutschland	G301Z
Probenteller	NEOLAB, Heidelberg, Deutschland	G301Z
Carbon Adhesive Leit-Tabs	Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland	G3347
Leit-Tabs (12 mm)	NEOLAB, Heidelberg, Deutschland	G334
Speicherschachtel	Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland	PAR 140 49-T
Thermal Paper For Mitsubishi Video Copy Processor	Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japan	K65HM-CE

**Tabelle 9-3: Immunhistochemie:**

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Art.-Nr.</u>
AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories INC., California, USA	SK-4200
Anti Prolyl-4-Hydroxylase beta Mouse IgG1	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	AF 0910-1
Anti-Fibroblast, clone TE-7	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland	CBL271

Anti-Fibronectin, rabbit polyclonal serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	F3648
Brij 35-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	1.01894.0100
Buffer solution pH 10.00	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland	513 340 056
Buffer solution pH 4.01	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland	513 340 057
Buffer solution pH 7.00	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland	513 340 059
Cover glass, round, 20 mm	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland	Z0121405
Culture slides 4-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	354104
Culture slides 8-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	354108
Detection System (HRP Label+ Biotinylated Link)	Biozol GmbH, Eching, Deutschland	951D-30
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	E6635
EnVision rb/m	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	K4061
Formalin 4%	Microcos GmbH, Garching, Deutschland	29188
Hemalaun	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	1.09249
Hydrogen peroxide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	21676-3
Monoclonal Antibody VE-Cadherin CD144	Beckmann Coulter Inc., Marseille, France	PN IM1597
Monoclonal Antibody, MS X Connexin 43	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland	MAB3067
Monoclonal Mouse Anti-Collagen, Type IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C1926

Monoclonal Mouse Anti-Human Clone CD31 Endothelial Cell	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	M0823
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Myosin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	M-3558
Proteinase K	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	S3020
Slide Superfrost-OT Plus	Schubert & Weiss-OMNILAB GmbH & Co.KG, Munich, Deutschland	9161155
Target Retrieval Solution 10x concentrate	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	S1699
Tris-Base	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	1.08382
Tris-Borate-EDTA, Buffer, 10x concentrate	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T4415-4L
Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	S1964
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9713.3

**Tabelle 9-4: rt-Polymerase chain reaction:**

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Art.-Nr.</u>
2-Mercaptoethanol, 99% BioUltra	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	63689
Agarose for routine use	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A9539-100G
Chloroform, Molecular Biology Tested	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C2432
ep T.I.P.S. Set, 0,5-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030 073.240
ep T.I.P.S. Standard, 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030 000.870

Ethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	1.08543
Ethidium bromide solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	46067
Gene Ruler Low Range DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	SM1191
Optical Caps	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland	4323032
Optical Tubes	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland	P39K7QA23 N801-0933
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	204054
QuantiTect Primer Assay GAPDH	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QT01192646
QuantiTect Primer Assay IL-1 $\alpha$	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QT00001127
QuantiTect Primer Assay IL-6	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QT00083720
QuantiTect Primer Assay IL-8	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QT00000322
QuantiTect Rev. Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	205311
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	74134
Safe Seal Tips, sterile, 1000 $\mu$ l	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland	781002
Safe Seal Tubes, 0.65 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	7060.1
Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030 120.086
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	15596-026
Uvette, Centre Height 8.5 mm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030 106.300

## **Laborausrüstung und Geräte:**

- Becherglas mit 3 Luer-Verbindungen, Sonderanfertigung, Gaßner Glastechnik GmbH, Munich, Deutschland
- Bio Photometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Cell Seeding Device, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland
- Clamp Forceps, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland
- Critical Point Dryer, CPD 30, Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Deutschland
- Digital Camera, EOS 300 D, Canon Inc., Japan
- Dissecting Scissors, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland
- Dressing Forceps, University of Munich Hospital, Munich, Deutschland
- Gefrierschrank -20°C, Comfort Plus, Siemens, Munich, Deutschland
- Gefrierschrank -80°C, HFU86, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Gel Electrophoresis Apparatus, Horizon 58, Life Technologies™, California, USA
- Incubator, APT line TM CB, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Incubator, Hera Cell, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Lab Digital Water Bath, Julabo SW23, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Laboratory air pump, Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
- Lamina Airflow, Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Leica DMR Mikroskop + Digital Camera DC 200 & IM50 Software Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Lichtmikroskop, Axiovert 35, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- MicroAmp 96-Well Tray/Retainer Set, Applied Biosystems Inc., California, USA
- Nalge Nunc Cryo 1°C Freezing container, Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark
- Neubauer Zählkammer, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
- Pipetboy, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Rasterelektronenmikroskop, S420, Leica, Brensheim, Deutschland

- Sequence detection system for Real-Time PCR, ABI PRISM 7700, Applied Biosystems Inc., California, USA
- Single channel pipettes (10, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Sputter Coater, SCD 50, Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Deutschland
- Ventricle Assist Device, MEDOS Medizintechnik AG, Stolberg, Deutschland
- Vortex-Mixer, MS1 Mini shaker, IKA Works, Staufen, Deutschland
- Zentrifuge, 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge, Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge, Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

## 9.1 Tabellen der rt-PCR Werte

Tabelle 9-5:

Gruppe A			Gruppe B		
<b>vor Perfusion</b>			<b>vor Perfusion</b>		
Gen	Expression	Deviation	Gen	Expression	Deviation
Il-1a	0,00033211	0,00048706	Il-1a	0,000075552	0,000113572
Il-6	0,02905215	0,01841128	Il-6	0,016999407	0,025209819
Il-8	0,22412641	0,26614174	Il-8	0,016232792	0,014440577
MCP-1	0,00886463	0,01338126	MCP-1	0,040102764	0,061363033
VCAM	0,00067438	0,00082724	VCAM	0,000493677	0,000571352
<b>HF Wand</b>			<b>nach KBR</b>		
Gen	Expression	Deviation	Gen	Expression	Deviation
Il-1a	0,00010449	0,00007331	Il-1a	0,00013688	0,00022733
Il-6	0,03565513	0,03631355	Il-6	0,04220791	0,07430597
Il-8	0,03069640	0,02379073	Il-8	0,01620078	0,00710081
MCP-1	0,14502548	0,12783007	MCP-1	0,10980282	0,14598299
VCAM	0,00124008	0,00104440	VCAM	0,00050601	0,00055580
<b>K+HF Wand</b>			<b>HF Segel</b>		
Gen	Expression	Deviation	Gen	Expression	Deviation
Il-1a	0,00046966	0,00102128	Il-1a	0,00015133	0,00007703
Il-6	0,10973381	0,18971725	Il-6	0,02984348	0,03354289
Il-8	0,02332742	0,02651620	Il-8	0,03046262	0,00513089
MCP-1	0,26387830	0,49113107	MCP-1	0,07337889	0,07562341
VCAM	0,00124014	0,00177881	VCAM	0,00078506	0,00079061
<b>K+HF Segel</b>			<b>VCAM</b>		
Gen	Expression	Deviation	Gen	Expression	Deviation
Il-1a	0,00013976	0,00009476	Il-1a	0,00011240	0,00125191
Il-6	0,07385046	0,14445639	Il-6		
Il-8	0,02762198	0,02605444	Il-8		
MCP-1	0,04154864	0,03509799	MCP-1		
VCAM	0,00111240	0,00125191	VCAM		

**Tabelle 9-5: rt-PCR-Resultate der Proben aus Gruppen A (links) und B (rechts).** Die Spalte „Expression“ zeigt Mittelwerte der Genexpression für IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM, „Deviation“ die dazugehörigen Standardabweichungen von jeweils 6 unabhängigen Experimenten der Gruppen A und B. Werte der linken Seite „Gruppe A“ bilden die Grundlage für Abbildung 14, Werte der rechten Seite „Gruppe B“ wurden in Abbildung 15 abgebildet.

**Tabelle 9-6:**

Endothelzellen		
Gen	Expression	Deviation
IL-1a	0,00009584	0,00010119
IL-6	0,00561356	0,00781299
IL-8	0,06951742	0,12975515
MCP-1	0,04783492	0,03758320
VCAM	0,00227849	0,00194592

Fibroblasten		
Gen	Expression	Deviation
IL-1a	0,00011868	0,00010638
IL-6	0,04968009	0,06555176
IL-8	0,00202623	0,00324944
MCP-1	0,08557476	0,08660599
VCAM	0,00041876	0,00052362

**Tabelle 9-6: rt-PCR-Resultate der Proben aus Endothelzellen- und Fibroblastenkulturen.** Die Spalte „Expression“ zeigt Mittelwerte der Genexpression für IL-1a, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM, „Deviation“ die dazugehörigen Standardabweichungen von jeweils 12 unabhängigen Zellkulturen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in Abbildung 14 abgebildet.

**Tabelle 9-7:**

Expression	HF Wand	K+HF Wand	HF Segel	K+HF Segel
IL-1a	0,001±0,000	0,001±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
IL-6	0,031±0,036	0,110±0,203	0,028±0,030	0,074±0,144
IL-8	0,023±0,020	0,023±0,020	0,030±0,006	0,033±0,028
MCP-1	0,132±0,108	0,264±0,503	0,091±0,060	0,042±0,035
VCAM	0,001±0,001	0,001±0,002	0,001±0,001	0,003±0,005

**Tabelle 9-7: Mittelwerte der rt-PCR-Resultate nach Perfusion in den Bioreaktoren.** Die pro-inflammatorischen Cytokine IL-6, IL-8 und MCP-1 wiesen eine höhere Expression nach Konditionierungs- mit anschließender highflow-Perfusion auf. Die Genexpression der Cytokine wurde auf die Expression des „housekeeping-genes“ GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten in jeder Gruppe angegeben. HF: highflow-Perfusion (Gruppe A), K+HF: Konditionierungs- und highflow-Perfusion (Gruppe B).



## ***Danksagung***

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. Christian Hagl, der es mir ermöglicht hat an seinem Institut der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München meine Promotion durchzuführen. Dabei stand mir seine Tür jederzeit für Fragen und Anregungen offen, wobei ich mich stets auf sein Engagement, seine konstruktive Unterstützung und seinen wissenschaftlichen Rat als erfahrenen Kollegen und Mentor verlassen konnte.

Dem Betreuer meiner Promotion, Herrn Dr. Ing. Bassil Akra, ebenso wie seinem Nachfolger Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder, gilt mein besonderer Dank. Sie haben mich von Beginn der Versuche bis zum letzten Satz der Dissertationsschrift begleitet und unterstützt. Beide trugen erheblich dazu bei, zielorientiert Prozesse zu beschleunigen und konnten mich mit ihrer Erfahrung im Bereich des Tissue Engineering hervorragend unterstützen. Dabei konnte ich mich stets auf ihre prompte Bereitschaft zur Hilfe verlassen, z.B. bei der Interpretation und Auswertung von Ergebnissen, zur Fehlersuche, oder einfach bei der Anwendung der verwendeten Methoden im Labor. Besonders Herrn Dr. Thierfelder, der mir auch in seiner Freizeit mit Rat und Tat zur Seite stand, gebührt mein größter Dank.

Ein großer Dank gilt auch Frau Ulrike Haas und Frau Trixi Hollweck, die mich bei der Erlernung und Durchführung der Methoden im Labor sowie der Kultivierung und dem Umgang mit Zellkulturen tatkräftig unterstützten. Für ihre Geduld, ihre Sorgfalt und Hilfsbereitschaft möchte ich mich hier bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gebührt meiner Familie, vor allem meiner Frau Franziska, die mich mit enormen Rückhalt, größter Motivation und unvorstellbarer Toleranz durch sämtliche Höhen und Tiefen dieser Promotion begleitet hat.

# Eidesstattliche Versicherung

**Erlmeier, Maximilian Peter**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **Tissue Engineering von zellbesiedelten Polyurethan-Aortenklappenprothesen – Einfluss von in-vitro Präkonditionierung im pulsatilen Bioreaktor**

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.

München, 09.06.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand