

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

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

In-vitro Tissue Engineering von zellbesiedelten Polyurethan-Scaffolds:  
Bildung von extrazellulärer Matrix unter Einfluss von endothelialer Beschichtung und  
pulsatilem Fluss

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Katja Witzel**

aus

**Stuttgart**

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Hagl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Nawid Khaladj Prof. Dr. Peter Müller Prof. Dr. Georg Nollert
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Nikolaus Thierfelder
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	09.01.2020



Für meine Familie



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>KURZFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>10</b>
3.1	Extrazelluläre Matrix .....	10
3.2	Tissue-Engineering-Prinzipien .....	11
3.2.1	Trägermaterialien .....	12
3.2.2	Zellressourcen .....	14
3.2.3	Zellbesiedelungstechniken .....	15
3.2.4	Bioreaktoren .....	16
3.3	Tissue Engineering von Herzklappen.....	18
3.4	Tissue Engineering von Gefäßen.....	21
3.5	Tissue Engineering von Myokard .....	23
<b>4</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>25</b>
5.1	Zellkultur.....	25
5.1.1	Isolation von Endothelzellen und Fibroblasten .....	25
5.1.2	Zellkultivierung.....	28

---

5.1.3	Kryopräservation.....	30
<b>5.2</b>	<b>Zellbesiedelung und Konditionierung .....</b>	<b>31</b>
5.2.1	Aufbau des Polyurethan-Teflon-Gerüsts und Vorbereitung der Zellträger .....	31
5.2.2	Besiedelung.....	33
5.2.3	Einteilung der Versuchsgruppen .....	35
5.2.4	Konditionierungsbioreaktor und Ablauf des Konditionierungsprozesses.....	36
<b>5.3</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie.....</b>	<b>38</b>
5.3.1	Allgemeines.....	38
5.3.2	Fixierung der Proben.....	40
5.3.3	Aufsteigende Alkoholreihe .....	40
5.3.4	Kritisch-Punkt-Trocknung.....	41
5.3.5	Sputtern .....	41
5.3.6	REM-Bildgebung.....	41
<b>5.4</b>	<b>LD-, Immunfluoreszenz- und histologische Färbungen.....</b>	<b>42</b>
5.4.1	Allgemeines.....	42
5.4.2	LD-Färbung.....	42
5.4.3	Probenfixierung .....	43
5.4.4	Schnittpräparation.....	43
5.4.5	Immunfluoreszenz .....	44
5.4.6	Histologische Färbung.....	45
<b>5.5</b>	<b>Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR).....</b>	<b>46</b>
5.5.1	Allgemeines.....	46
5.5.2	Probenverarbeitung und Lagerung.....	47
5.5.3	RNA-Isolation.....	47

---

5.5.4	Reverse Transkription.....	48
5.5.5	Real-Time PCR.....	48
<b>5.6</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>49</b>
5.6.1	Semiquantitative Auswertung.....	49
5.6.2	Statistische Auswertung .....	49
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>6.1</b>	<b>Topographische Auswertung .....</b>	<b>50</b>
6.1.1	Unbeschichtetes Polyurethan.....	50
6.1.2	Polyurethan-Scaffolds nach Zellbesiedelung.....	51
6.1.3	Polyurethan-Scaffolds nach statischer Kultivierung.....	53
6.1.4	Polyurethan-Scaffolds nach dynamischer Konditionierung.....	55
<b>6.2</b>	<b>Zellvitalität .....</b>	<b>57</b>
6.2.1	Immunzytologie .....	57
6.2.2	LD-Färbungen .....	58
<b>6.3</b>	<b>Zellbesiedelungsnachweis mittels Immunfluoreszenz.....</b>	<b>62</b>
<b>6.4</b>	<b>Nachweis extrazellulärer Matrixbestandteile mittels Immunfluoreszenz.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5</b>	<b>Histologische Färbung .....</b>	<b>70</b>
<b>6.6</b>	<b>rt-PCR.....</b>	<b>73</b>
<b>6.7</b>	<b>pH-Wert-Messungen.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>

---

<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>98</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	98
10.2	Tabellenverzeichnis.....	99
10.3	Materialien .....	100
10.4	Einverständniserklärung für Patienten zur Zellspende.....	107
10.5	Vorversuch: Zellquantifizierung zur Besiedelung .....	108
10.6	Gassterilisation des PU-Materials .....	110
10.7	Zellauszählungen nach Besiedelung.....	111
10.8	Gelelektrophorese zur Bestimmung der RNA-Integrität.....	112
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>113</b>
<b>12</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>114</b>

# 1 Kurzfassung

Der Ersatz erkrankter Organ- und Gewebestrukturen des Herz-Kreislauf-Systems erlangt aufgrund der steigenden Anzahl an kardiovaskulären Erkrankungen zunehmende Bedeutung. Eine Möglichkeit, welche erkrankte Strukturen in ihrer Gesamtheit unter Erhalt der Funktionalität und Bewahrung der morphologischen Eigenschaften ersetzen könnte, ist Bestand des Forschungsgebiets des kardiovaskulären Tissue Engineerings (TE). Entscheidendes Merkmal der tissue-engineerten Konstrukte ist deren Vitalität: Dabei sind es vitale Zellen, welche ein funktionelles und morphologisch ähnliches Ersatzgewebe auf Trägermaterialien bilden. Dieses Ersatzgewebe ermöglicht im Idealfall Wachstum, Regeneration und Entwicklung des Konstruktes zu gesundem, kardiovaskulärem Gewebe. Diese Arbeit analysiert die Bildung extrazellulärer Matrix (EZM) auf einem Polyurethan (PU)-Trägermaterial unter Vergleich unterschiedlicher Besiedelungs- und Konditionierungsregime.

Humane Endothelzellen (EC) und Fibroblasten (FB) konnten aus Vena saphena magna-Segmenten enzymatisch isoliert werden. Vorab wurden vier Gruppen (G1 - G4) à fünf tubulären PU-Scaffolds (Durchmesser = 3,3 cm) bestimmt. Zunächst wurden die PU-Scaffolds aller Gruppen für 24 Stunden mit FB (750.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) dynamisch besiedelt und folgend für drei Tage statisch kultiviert. Anschließend konnten die PU-Scaffolds zweier Gruppen zusätzlich mit EC (750.000/cm<sup>2</sup>) für 24 Stunden dynamisch besiedelt und für drei Tage statisch kultiviert werden. Im Anschluss an die Besiedelungsprozesse wurden die PU-Scaffolds für sieben Tage entweder statisch kultiviert oder dynamisch konditioniert. Die dynamische Konditionierung erfolgte in einem Bioreaktor unter Anwendung eines pulsatilen Flusses mit einer initialen Flussrate von 690 ml/min, welche nach drei Tagen auf 2.100 ml/min erhöht wurde. Entnommene Proben konnten mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM), Live/Dead® (LD), Immunfluoreszenz- (IF) und histologischen Färbungen sowie quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) analysiert werden. Nach statischer Kultivierung und dynamischer Konditionierung wurden pH-Wert-Messungen des Mediums durchgeführt.

Die REM-Analyse bestätigte das Vorhandensein einer Zellschicht auf dem PU-Material. In den LD-Färbungen aller Proben war die Mehrheit der Zellen vital. Die Anwesenheit von FB und EC bestätigte der Nachweis von TE-7 (FB-spezifisch) und von-Willebrand-Faktor (vWF; EC-spezifisch) in IF-Färbungen. Weitere IF- und histologische Färbungen ergaben die Anwesenheit von

EZM-Bestandteilen: Elastin, Fibronectin sowie Kollagene. Eine EC-Besiedlung mit dynamischer Konditionierung förderte die Bildung von EZM-Bestandteilen.

PU als synthetisches Trägermaterial sowie humane FB und EC eigneten sich für den vorliegenden Versuchsansatz. Die Exposition der Zellen gegenüber dem pulsatilen Fluss im Bioreaktor provozierte die Entstehung von EZM-Bestandteilen. Insgesamt führten sowohl dynamische Besiedlungs- als auch dynamische Konditionierungsprozesse zu einer verbesserten Zellmorphologie und damit zu einer gesteigerten EZM-Bildung. Im Vergleich waren weniger EZM-Bestandteile in den statisch kultivierten Proben nachzuweisen. Die zusätzliche Beschichtung mit EC wirkte sich positiv auf die Bildung der EZM aus. Die FB-Schicht stellte eine optimale Grundlage für die EC-Adhäsion dar. Die alleinige Besiedelung der PU-Scaffolds mit FB führte zu einem Ablösen der Zellen und damit zu einer reduzierten EZM-Bildung.

In Hinblick auf die weltweit hohe Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Regeneration von Gefäßen und Myokard sowie die Herstellung von tissue-engineerten Herzklappen (TEHV = engl. tissue-engineered heart valve) von besonderem klinischen Interesse. Fortschritte auf dem Gebiet des kardiovaskulären TE können zum zukünftigen Ersatz von dysfunktionalem Gewebe einen entscheidenden Beitrag leisten.

## 2 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen bedingen weltweit die Mehrheit aller Todesfälle. Diese Erkrankungen sind unter anderem Herzklappendysfunktionen, Gefäßerkrankungen und Defekte am Herzmuskel. Schätzungsweise sind im Jahr 2015 17,7 Millionen Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Krankheit verstorben, was 31% der weltweiten Todesfälle darstellt [1]. In 2030 soll die Zahl auf 23,3 Millionen ansteigen [2]. Ein erheblicher Anteil der kardialen Erkrankungen sind durch Herzklappendefekte bedingt. Ursächlich für den Verlust der Funktionalität der Herzklappe sind hauptsächlich altersbedingte Degeneration, rheumatisches Fieber, kongenitale Fehlbildungen, Endokarditiden, hoher Blutdruck und Atherosklerose sowie Folgen eines Herzinfarktes [3, 4]. Dabei können vaskuläre Erkrankungen sowohl Ursache als auch Folge der Herzkrankheit sein.

Insbesondere stellt sich das rheumatische Fieber in Entwicklungsländern als ein beständiger Risikofaktor für die Entstehung von Herzklappendefekten dar. Jedes Jahr werden schätzungsweise über 200.000 Neuerkrankungen an rheumatischem Herzleiden berichtet, wobei vornehmlich Kinder im Schulalter betroffen sind [5, 6]. Durch die stetige Zunahme der Lebenserwartung können ansteigende Zahlen an Herzklappenerkrankungen prognostiziert werden. Bei älteren Patienten werden vermehrt degenerative, meist altersbedingte Veränderungen der Herzklappen festgestellt [7]. Weiterhin zeigt sich besonders in Industrienationen eine vermehrte Inzidenz an Endokarditiden bei älteren Patienten [8]. Der Krankheitsverlauf wird dabei durch altersbedingte Komorbiditäten kardiologischer und nicht-kardiologischer Genese ungünstig beeinflusst [3, 7].

In Anbetracht der weltweit steigenden Prävalenz an Herzklappenerkrankungen ergibt sich ein stetig wachsender Therapiebedarf. Dabei ist der Ersatz der defekten Herzklappe auch in Zukunft eine wichtige Behandlungsoption [9, 10]. Es wird angenommen, dass die Patientenzahl, welche einen Herzklappenersatz benötigt, von 290.000 in 2003 auf über 850.000 in 2050 weltweit zunehmen wird [11].

Grundsätzlich werden mechanische von biologischen Herzklappen unterschieden. Mechanische Herzklappen zeichnen sich zwar durch eine hohe Lebensdauer aus, bedürfen jedoch einer lebenslangen Antikoagulation aufgrund des erhöhten Thromboserisikos [12]. Biologische Herzklappen zeigen nach ungefähr 10 - 15 Jahren strukturelle Veränderungen im Sinne einer Klappendegeneration. Zudem sind beide Prothesentypen anfällig für Endokarditiden und nicht wachstumsfähig,

sodass Re-Operationen erforderlich werden können. Aufgrund genannter Einschränkungen bisheriger Prothesentypen und der Frage nach der zukünftigen Versorgungsmöglichkeit zeigt sich der Bedarf eines alternativen Herzklappenersatzes. [12-16]

Neben valvulären zählen die ischämischen Herzerkrankungen und die Folgen eines Herzinfarktes zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Rund 80% der Todesfälle an kardiovaskulären Erkrankungen in 2015 waren durch Herzinfarkte und Schlaganfälle bedingt [1]. Für den Ersatz kleinkalibriger Gefäße wie die Koronarien werden üblicherweise Segmente körpereigener Venen oder Arterien verwendet. Venöse Bypässe zeigen jedoch eine hohe Verschlussrate, weshalb häufig Re-Operationen notwendig werden. Arterielle Bypässe sind beispielsweise bei einer koronaren Dreigefäßerkrankung nur eingeschränkt einsetzbar. Im Bereich der Therapie von vaskulären Erkrankungen werden großkalibrige Gefäße wie die Karotiden bereits erfolgreich durch synthetische Materialien ersetzt bzw. repariert. [17-20]

Die Regeneration von geschädigtem Herzmuskelgewebe nach einem Herzinfarkt oder bei Herzinsuffizienz ist sehr begrenzt. Die Zellen des Herzmuskels, Kardiomyozyten, weisen ein sehr reduziertes Regenerationspotenzial auf [21]. Bisherige Therapiemöglichkeiten lindern zwar die Symptome und verbessern die Prognose, stellen aber keinen kausalen Therapieansatz im Sinne eines Ersatzes des abgestorbenen Herzmuskels dar. Die Herztransplantation kann im Endstadium einer Herzinsuffizienz eine mögliche Therapie darstellen [22, 23]. Hier ist jedoch die Knappheit von Spenderorganen hervorzuheben, weshalb die Notwendigkeit alternativer Therapiestrategien besteht. [24]

In Anbetracht der Einschränkungen bisheriger Therapiemöglichkeiten stellen mittels TE hergestellte Implantate eine vielversprechende Alternative in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Das grundlegende Prinzip des TE ist, dysfunktionale Organe durch strukturähnliches und funktionelles Material, welches aus einem Gefüge von Trägersubstanz und Zellen besteht, zu ersetzen [25, 26]. Verwendung als Trägermatrix finden biologische Strukturen wie native Herzklappen oder künstliche Gerüste aus Polymeren [27]. Die Zellen entstammen meist einem autologen (gleiches Individuum) Organismus, da Transplantate allogener (anderes Individuum) oder xenogener (andere Spezies) Herkunft eine immunologische Reaktion auslösen [27]. Die auf den Trägermaterialien haftenden Zellen bilden neues Gewebe, wobei dieses durch äußere Einflüsse unterschiedliche biomechanische Eigenschaften entwickeln kann. Hierfür werden meist Bioreaktoren verwendet. In Bioreaktoren, welche *in-vitro* physiologische Bedingungen imitieren, kann das



Gewebe stimulierenden Faktoren ausgesetzt werden. Dadurch kann vor Implantation eine Adaptation des Gewebes auf „*in-vivo* ähnliche“ Bedingungen erfolgen. [28]

Die Weiterentwicklung von tissue-engineerten Strukturen zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen ist aufgrund genannter Limitationen bisheriger Therapiemöglichkeiten von großem Interesse. Ziel der folgenden Arbeit war die Entwicklung der EZM auf zellbesiedelten PU-Gerüsten zu analysieren. Als Zellquelle dienten aus humanen Venen isolierte FB und EC. Insbesondere sollten mögliche Auswirkungen eines pulsatilen Flusses und einer EC-Schicht auf das Gesamtkonstrukt untersucht werden.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Extrazelluläre Matrix

Die EZM ist eine dynamische, aktive Struktur, welche mit umgebenden Zellen interagiert. Dynamisch bedeutet hier, dass sich die EZM an umgebende Bedingungen anpassen und umstrukturieren kann. Die Änderung der EZM-Struktur geschieht als Reaktion auf modulierende Zell- und Wachstumssignale [29]. Zusätzlich dient die EZM als stabiles, formgebendes Gerüst der Zellverankerung und moduliert über Wachstums- und Signalfaktoren die Zellfunktion [30]. Weiterhin verleiht die EZM dem Gewebe mechanische Eigenschaften wie Festigkeit und Dehnbarkeit. Fasern und Grundsubstanz bilden zwei Komponenten der EZM. Die Fasern untergliedern sich in Kollagen-, elastische und retikuläre Fasern und die Grundsubstanz in Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Adhäsionsproteine [31, 32]. Die einzelnen Komponenten erfüllen eine Vielzahl an Funktionen: Kollagene bewahren die Gewebeform und bieten Stabilität, wohingegen Elastin für Elastizität sorgt. Die Komponenten der Grundsubstanz sind unter anderem für biologische Funktionen wie die Zelladhäsion, -migration, -interaktion und die Speicherung von Wasser verantwortlich. Zur Bildung und Entwicklung der EZM tragen je nach Gewebeart unterschiedliche Zelltypen bei, darunter vor allem FB und auch EC. Insgesamt stehen die EZM und umgebende Zellen in Wechselwirkung miteinander und ermöglichen so die konstante Anpassung an dynamische Prozesse wie Wundheilung. [33-35]

Die Vielzahl an Funktionen, der komplexe Aufbau sowie die stetigen Umbauprozesse der nativen EZM stellen eine Herausforderung dar dieses komplexe Konstrukt nachzubauen [35]. Ziel des TE ist mittels geeigneter Trägermaterialien (Scaffolds) den Zellen eine EZM-ähnliche Struktur zu bieten, um somit eine weitgehend intakte Zellfunktion zu ermöglichen [35]. Vitale, funktionierende Zellen wiederum gewährleisten die Bildung einer vitalen EZM, welche als gesundes Ersatzgewebe erkrankte Strukturen ersetzen sowie Funktionen der nativen EZM erfüllen kann. [35]

### 3.2 Tissue-Engineering-Prinzipien

Eine mögliche Übersetzung des Begriffes TE ist „Gewebezüchtung“ [36]. Das TE versteht sich als multidisziplinäres Fachgebiet, indem es die Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Naturwissenschaften vereint und sich biomedizinischem Wissen und Verständnis über physiologische und pathologische Gewebe- und Organfunktionen bedient. Ziel ist die Entwicklung vitalen Ersatzgewebes, um damit Gewebefunktionen zu erhalten, zu verbessern und wiederherzustellen. [37]

Eine der ersten Arbeiten aus 1993 beschreibt die drei auch heute gültigen Vorgehensweisen bei der Herstellung von Geweben und Organen [25]: Der erste Ansatz beschreibt die alleinige Transplantation von selektierten Zellen mittels gezielter Injektion. Dieses Verfahren gewährleistet die erhöhte lokale oder systemische Konzentration des gewünschten Zelltyps und vermeidet einen chirurgischen Eingriff. Ein zweiter Ansatz beschreibt die Implantation einer strukturgebenden, meist azellulären Matrix, welche die Form des Zielgewebes bereits besitzt. Die Matrix wird durch autologe Zellen *in-vivo* besiedelt und entwickelt sich zum intakten Ersatzgewebe. Der wesentliche Ansatz und die Grundlage des heutigen TE beschreibt die Kombination von lebenden Zellen mit einer Trägersubstanz (Scaffold). Dem Empfänger entnommene oder Zellen anderer Herkunft werden isoliert und *in-vitro* gezüchtet. Diese Zellen werden mit einem biologischen oder synthetischen Trägermaterial verbunden, sodass unter *in-vitro* Bedingungen ein funktionsfähiges Ersatzgewebe zur Implantation entsteht. [36]

Besonders relevant für den Erfolg der implantierten Konstrukte ist die Biokompatibilität der Scaffolds, d.h. die Verträglichkeit der verwendeten Materialien im menschlichen Körper. Dabei soll sich das Implantat chemisch, physikalisch, biologisch und morphologisch dem Empfängerorganismus anpassen. Biokompatible Implantate sind atoxisch und können mit dem umliegenden Gewebe eine Bindung entwickeln (bioaktiv) oder durch das Gewebe ersetzt werden (resorbierbar/abbaubar). An inerte Implantatmaterialien lagert sich das Gewebe oberflächlich an. Beispielsweise begünstigen inerte, poröse Implantate das Einwachsen des Gewebes in das Material. Biokompatible, tissue-engineerte Implantate könnten ein geringes Risiko der Infektion, der Thrombusformation, der Hämolyse und der Fremdkörperreaktion aufweisen. Durch Konstruktion vitaler Implantate könnten Regeneration und Entwicklung des Gewebes erreicht werden, sodass der Ersatz länger haltbar und funktional wäre. Zusätzlich würden vitale Strukturen des Implantates besonders im pädiatrischen Patienten mitwachsen können und somit Re-Operationen vermeiden. [38-41]

### 3.2.1 Trägermaterialien

Eine Vielzahl an Trägermaterialien für kardiovaskuläre TE-Strukturen wurde entwickelt, um möglichst das natürliche Gewebe zu imitieren, sowie die Avitalität konventioneller Implantatmaterialien zu umgehen. Die dreidimensionale Form des Scaffoldmaterials stellt eine orientierende Gerüststruktur für adherierende Zellen sowie ein stabiles Konstrukt zur Gewebeformation zur Verfügung. Zusätzlich zur Adhäsion der Zellen soll das Material die Zellmigration und -proliferation sowie das Einwachsen von Gewebe in das Innere der Gerüststrukturen unterstützen. Begünstigt wird diese Scaffold-Gewebe-Interaktion besonders durch poröse Scaffoldmaterialien, welche außerdem durch ihre Poren eine Diffusion von Zellmetaboliten und -nährstoffen ermöglichen. Die verwendeten Materialien sollten dynamische Veränderungen in ihrer Architektur erlauben, dennoch aber mechanisch und strukturell belastbar sein sowie bei Sterilisation formstabil bleiben bzw. steril herzustellen sein. Eine besonders relevante Eigenschaft ist zusätzlich die biologische Verträglichkeit des Materials, sodass dieses keine immunologischen oder entzündlichen Reaktionen im Körper hervorruft oder durch toxische Abbauprodukte Zellfunktionen beeinträchtigt. [28, 42, 43]

Zur *in-vitro* Konstruktion von kardiovaskulären Strukturen konnten bisher zwei Scaffoldtypen als Zellträger erprobt werden: Materialien synthetischer sowie biologischer Herkunft. Synthetisch bzw. künstlich hergestellte Zellträger basieren auf abbaubaren Polymeren wie Polyglykol- (PGA) oder Polymilchsäuren oder auf nicht-abbaubaren Polymeren wie Polyurethan. Ein wesentlicher Vorteil von synthetischen Materialien ist, dass deren Eigenschaften gemäß den Anforderungen an das Endprodukt spezifisch bestimmt und kontrolliert werden können. Nachteile bestehen darin, dass die synthetischen Konstrukte nicht vollständig das natürliche Gewebe in seiner Struktur und Funktion nachahmen können. So weisen aus PGA hergestellte Scaffolds eine erhöhte Steifheit, Festigkeit sowie Dicke auf, was beispielsweise zu Einschränkungen in der dynamischen Funktion der TEHV führen kann [44]. Gezeigt werden konnte, dass eine Verbindung verschiedener Polymerarten in einer verbesserten mechanischen Funktionalität des Scaffolds resultieren kann [45]. Neben Polymer-basierten Scaffolds, welche entweder porös oder faserig sind, können synthetische Hydrogele hergestellt werden. Diese Hydrogele bestehen aus hydrophilen Polymerkettennetzwerken wie Polyethylenglykol und zeigen auch eine strukturelle Ähnlichkeit zur EZM [26]. Die Kombination mit biologischen Hydrogelen aus Fibrin oder anderen EZM-Bestandteilen verbesserte die Bioaktivität der synthetischen Hydrogele. Dennoch zeigen die Hydrogele schwache mechanische Eigenschaften, welche für die *in-vivo* Haltbarkeit des Implantats essentiell sind. [27, 46, 47]

Biologische Scaffolds bestehen aus Komponenten der EZM wie Kollagen, Fibrin, Elastin, Hyaluronsäure, Glykosaminoglykanen oder aus dezellularisiertem Gewebe. Zweck der Dezellularisierung ist die Beseitigung möglicher zellulärer Antigene, welche eine immunologische Reaktion nach Implantation auslösen. Nach der Dezellularisierung bleibt somit theoretisch ausschließlich die intakte EZM-Struktur zurück. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Form und damit die komplexen strukturellen Eigenschaften dem nativen Äquivalent entsprechen. Schwierigkeiten ergeben sich in der geringen Bioaktivität der dezellularisierten Konstrukte, was durch Re-Besiedelung verbessert werden kann [48]. Weiterhin muss trotz Entfernung der zellulären Komponenten die Gewebeintegrität erhalten bleiben, also ein potenzieller Schaden der EZM aufgrund von Dezellularisierungsvorgängen vermieden werden. [49, 50]

Die synthetischen und biologischen Materialien können resorbierbare oder nicht-resorbierbare Eigenschaften aufweisen. Resorbierbare Materialien bieten eine zeitweilige Gerüststruktur für adhärierende Zellen und der von Zellen synthetisierten EZM. Zeitgleich zur de novo Synthese der Matrix wird *in-vivo* das Material sukzessiv resorbiert, sodass idealerweise bei vollständigem Materialabbau eine formstabile, eigenständige Struktur ohne Fremdmaterial zurückbleibt. Problematiken ergeben sich hierbei, wenn die neu gebildete Matrix zum Zeitpunkt des Materialabbaus keine ausreichend stabilen mechanischen Eigenschaften aufrechterhalten kann oder der Materialabbau insuffizient erfolgt (*siehe Abb. 3.1*). Toxische Abbauprodukte des Materials können sich außerdem negativ auf die Matrixformation auswirken. Nicht-resorbierbare Materialien bieten den Vorteil der langfristigen Aufrechterhaltung einer stabilen und für Zellen orientierenden Struktur, was sie zu belastbaren Materialien macht. Nachteile ergeben sich aus dem möglichen Verbleib von Fremdmaterial im Körper sowie damit verbundenen Fremdkörperreaktionen. [51, 52]

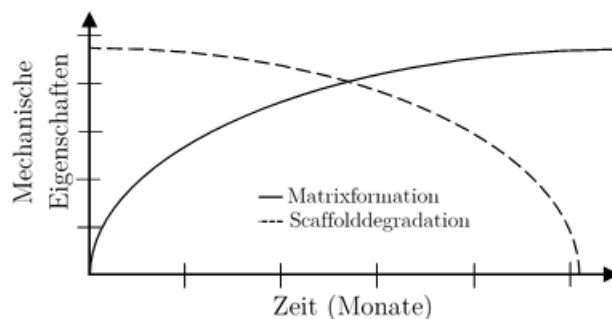


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der mechanischen Eigenschaften eines resorbierbaren Scaffolds und der Matrix.

Der Degradation des resorbierbaren Scaffolds steht der Aufbau der Matrix gegenüber. Die Stabilität der gebildeten Matrix ist bei einem verfrühten Materialabbau nicht gewährleistet. [53].

### 3.2.2 Zellressourcen

Grundlegendes Prinzip in der Herstellung funktioneller kardiovaskulärer Strukturen ist eine Besiedelung mit Zellen. Hierfür stehen embryonale, postembryonale (adulte und induzierte pluripotente) Stammzellen oder ausdifferenzierte Zellen zur Verfügung, welche autologer, allogener oder xenogener Herkunft sein können. Die Besiedelung mit autologen Zellen vermeidet immunologische Reaktionen, die mit allogenen oder xenogenen Zellpopulationen assoziiert sind [54]. Autologe, ausdifferenzierte FB und EC aus venösen oder arteriellen Gefäßen sind leicht zu isolieren und zu vermehren, bedürfen aber einer Entnahme aus dem Empfängerorganismus. Limitationen in der Anwendung ausdifferenzierter Zellen ergeben sich vor allem bei Patienten in höherem Alter. Grund ist die reduzierte Fähigkeit zu Vermehrung und Wachstum von Zellen dieses Patientenkollektivs aufgrund von oftmals dysfunktionalem Endothel [49]. In Anbetracht dessen sind isolierte Zellen aus dem venösen System, welches weniger anfällig für degenerative Prozesse wie Atherosklerose ist und besser verfügbar ist, jenen aus dem arteriellen System zu bevorzugen [55].

Im Fokus aktueller Forschungen stehen besonders Stammzellen, welche durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und das Potenzial sich in verschiedenartige Gewebe auszdifferenzieren definiert sind [56]. Die Entnahme adulter Stammzellen erfolgt über die Nabelschnur, über eine Beckenkammpunktion aus dem Knochenmark oder über eine periphere Blutentnahme. Vorteile der adulten Stammzellen sind nicht nur in ihrer vielversprechenden Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit begründet, sondern auch in ihrer einfachen Gewinnung. So bedarf es zur Gewinnung der Zellen keiner Entnahme von Gefäßsegmenten, weshalb diese Zellpopulation unter anderem bei pädiatrischen Patienten Anwendung findet. Dabei sind die aus der Nabelschnur gewonnenen Stammzellen häufig verfügbar und können bei kongenitalen Herzvitien verwendet werden. Hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut haben zwar die Fähigkeit vaskuläre EC zu ersetzen, jedoch sinkt im Laufe des Alters die Zellanzahl im peripheren Blut [57]. Stammzellen des Knochenmarks oder aus der Nabelschnur gewonnene Stammzellen bildeten Herzklappenewebe, dessen mechanische Eigenschaften nativem Gewebe glich. Beispielsweise zeigte eine durch mesenchymale Stammzellen hergestellte Herzklappe *in-vivo* vielversprechende Ergebnisse [51]. Den Vorzügen der Stammzellen entgegen steht bei ihrem Einsatz das Risiko des unkontrollierten Wachstums und auch die Frage nach der Kontrolle der Differenzierung bleibt unklar. Embryonale Stammzellen zeigen zwar das höchste Differenzierungspotenzial, sind in ihrer Verwendung jedoch ebenfalls eingeschränkt: Ethische Bedenken [58], die Möglichkeit der Tumorentstehung [59] sowie

immunologische Reaktionen limitiert deren klinischen Einsatz. Weniger ethische Bedenken bestehen bei induzierten pluripotenten Stammzellen, welche durch Re-Programmierung von ausdifferenzierten Zellen die Fähigkeit zur Pluripotenz wiedererlangen. [59-62]

Unabhängig von Einschränkungen der jeweiligen Zellpopulation ist eine Re-Endothelialisierung von Trägermaterialien unabdingbar für den Langzeiterfolg von hergestelltem Gewebe. Eine intakte EC-Schicht trägt entscheidend zur Antithrombogenität des Scaffolds bei und moduliert zusätzlich darunterliegende interstitielle Zellen [63]. Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher keine optimale Zellquelle für kardiovaskuläre TE-Konstrukte festgelegt werden. Neben den Eigenschaften der Zellen, beeinflussen äußere Faktoren wie das Alter des Patienten, die Dauer der Zellentnahme bis zur Isolation sowie die Entnahmemethode über die Qualität der verwendeten Zellen [64].

### 3.2.3 Zellbesiedelungstechniken

Neben der *in-vivo* Besiedelung der Trägermaterialien beschreibt der klassische Ansatz des TE die Entwicklung funktionstüchtiger kardiovaskulärer Konstrukte unter *in-vitro* Bedingungen: Nach Isolation und Vermehrung der Zellen erfolgt *in-vitro* die Besiedelung des Scaffolds und die Gewebbildung. Die erfolgreiche Adhäsion der Zellen an das Scaffoldmaterial beeinflusst dabei das Zellwachstum und die Synthese des Bindegewebes. Dabei ist die Oberflächenbeschaffenheit des Trägermaterials entscheidend für die Zelladhäsion *in-vitro*. Durch Erhöhung der Porosität und Größe des Trägermaterials kann neben Anpassung der Zellanzahl und -dichte eine verbesserte Zelladhäsion erreicht werden [28]. Eine optimale Grundlage für die erfolgreiche Adhäsion von EC bietet eine vorangehende Besiedelung mit FB [65]. Die Besiedelung der Trägermaterialien kann unter statischen oder dynamischen Bedingungen erfolgen. Eine dynamische Besiedelung in rotierenden Vorrichtungen führte zu Verbesserungen der Besiedelungseffektivität. [66-68]

### 3.2.4 Bioreaktoren

Gesundes, natives kardiovaskuläres Gewebe ist *in-vivo* multiplen Stressoren ausgesetzt. Mechanische Belastungen wie Flexion, Spannungen und Scherstress bedürfen einer kontinuierlichen Adaption des Gewebes an die hämodynamische Umgebung, um eine korrekte Funktion aufrechtzuerhalten [69, 70]. Dabei sind es Zellen, welche Beanspruchungen des Gewebes wahrnehmen und über Zell-EZM-Wechselwirkungen Anpassungsprozesse initiieren. Bei zellbesiedelten, *in-vitro* hergestellten kardiovaskulären Strukturen ist daher vor Implantation die Anpassung des Gewebes an die Beanspruchungen *in-vivo* notwendig. Diese sogenannte *in-vitro* Konditionierung imitiert *in-vivo* Bedingungen und führt zur Gewebeadaptation. Es bilden sich zielgerichtet gewebespezifische Strukturen aus, welche fähig sind den biomechanischen Kräften *in-vivo* standzuhalten. [71, 72]

Die Konditionierung des Gewebes bzw. Vorbereitung des tissue-engineerten Implantates auf die physiologischen Beanspruchungen muss in einem Bioreaktor stattfinden. Laut Definition ist ein Bioreaktor eine abgegrenzte Vorrichtung, in welcher unter definierten und kontrollierten Bedingungen biologische Prozesse ablaufen, Mikroorganismen sowie Zellen kultiviert werden können [73]. Somit ermöglicht der Bioreaktor *in-vitro* eine Simulation von physiologischen Bedingungen: Der Austausch von Nährstoffen, Metaboliten, regulatorischen Molekülen und Gasen kann durch den Bioreaktor ermöglicht werden; hämodynamische Bedingungen wie Blutfluss, Scherkräfte und Druckverhältnisse können bei einem entsprechend konstruierten Bioreaktor eingestellt werden. Dadurch kann die Zellanordnung und -vermehrung verändert sowie die Bildung einer EZM gefördert werden. [74]

Unterschieden werden statische von dynamischen Bioreaktorsystemen. Ein statisches System erlaubt die Kultivierung von Zellen unter optimalen Zellkulturbedingungen ohne Zirkulation des Zellkulturmediums oder anderweitigen Reizen. Per definitionem ist somit eine Zellkulturflasche oder Petrischale das einfachste Beispiel für einen statischen Bioreaktor. Hierbei wird die kontinuierliche Versorgung der Zellkultur sichergestellt, um Funktion und Vitalität der Zellen zu gewährleisten. Die Simulation des natürlichen Gewebemilieus unter Bestimmung und Kontrolle der Basisparameter wie Temperatur, Sauerstoff, pH-Wert sowie manueller Austausch des Nährmediums und Bewahrung der Sterilität ist durch ein statisches System möglich. Neben der Zellkultivierung kann auch eine Besiedelung von Scaffolds unter statischen Bedingungen in einem Bioreaktorsystem stattfinden. Statisch besiedelte Scaffolds zeigten ungleichmäßiger verteilte Zellen sowie einen geringeren Zellstoffwechsel im Vergleich zu dynamisch besiedelten Scaffolds. [73, 75-77]



Dynamische Vorrichtungen können eine mechanische Stimulation der besiedelten Scaffolds ermöglichen. Beispielsweise kann durch Fluss des Kulturmediums Scherstress erzeugt werden. Dadurch wird besonders in dreidimensionalen Zellträgern eine verbesserte Nährstoffversorgung im Vergleich zu statischen Bedingungen gewährleistet. In dynamischen Besiedelungsbioreaktoren kann durch die Bewegung des Bioreaktors eine ständige Durchmischung und Bewegung der Zellsuspension erreicht werden. Hiermit wird eine homogene Verteilung der Zellen auf der gesamten Oberfläche eines dreidimensionalen Zellträgers ermöglicht. Dynamische Konditionierungsbioreaktoren schaffen ein annähernd physiologisches Milieu, indem ein Teil der *in-vivo* herrschenden biomechanischen Bedingungen simuliert werden. Durch Einwirkung von physikalischen Größen wie Fluss, Druck, Dehnung und Kompression sowie (bio-)chemischen Faktoren auf das Zell-Matrix-Konstrukt kann die Ausbildung einer intakten EZM *in-vitro* unterstützt werden. So führte beispielsweise die Anwendung eines pulsatilen Flusses auf tissue-engineerte Arterien zu einer vermehrten Kollagenproduktion [78]. Dynamisch konditionierte TEHV unter Anwendung eines pulsatilen Flusses und Druckes zeigten Verbesserungen in der EZM-Bildung, der histologischen Struktur sowie der mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu statisch konditionierten Konstrukten [45]. Ein wesentlicher Vorteil von dynamischen Konditionierungsbioreaktoren liegt darin, dass eine kontrollierte Entwicklung des tissue-engineerten Gewebes *in-vitro* möglich ist. So können die Bedingungen im Bioreaktorsystem bestimmt, beobachtet und entsprechend angepasst werden. Durch die kontinuierliche Adaption der Zellen an die *in-vitro* Belastungssituation und die Zellreaktion auf mechanische Stimuli entsteht eine geordnete Zellstruktur sowie ein funktionsfähiges EZM-Gerüst. [79-82]

### 3.3 Tissue Engineering von Herzklappen

Im Jahr 1995 wurden erstmals die Eigenschaften einer idealen TEHV definiert [83]: Diese sollte sich strukturell in die nativen kardiovaskulären Strukturen integrieren, um langfristig eine physiologische Funktion aufrechterhalten zu können. Voraussetzungen für eine uneingeschränkte Funktion sind weiterhin die Vitalität und Biokompatibilität der TEHV, eine athrombotische Oberfläche, die Fähigkeit zu Wachstum und Regeneration, kein Infektions- und kein Immunreaktionspotenzial [43]. Um zusätzlich zugänglich für eine Vielzahl von Patienten zu sein, bedarf es einer hohen Verfügbarkeit der TEHV. Die Schaffung dieser idealen Herzklappenprothese steht im Fokus aktueller Forschungen des TE. Bisher zeigten drei etablierte Herstellungsmethoden vielversprechende Ergebnisse: Besiedelte synthetische Prothesen aus resorbierbarem oder nicht resorbierbarem Material, besiedelte Prothesen aus biologischem Material und dezellularisierte Bioprothesen. [26, 84]

Synthetische, nicht-resorbierbare Scaffoldmaterialien wie PU bieten eine stabile, lang haltbare Grundstruktur (*siehe Abb. 3.2; A*). Besiedelt mit autologen Zellen ist eine athrombogene Oberfläche gewährleistet. Ist das Material resorbierbar ersetzt die von den Zellen gebildete EZM das abgebaute Trägermaterial nach einiger Zeit *in-vivo*. Zurück bleibt einzig das durch autologe Zellen entstandene Ersatzgewebe, welches das dysfunktionale Gewebe ersetzt. Die entstandene, intakte EZM besitzt Wachstums- und Anpassungspotenzial. [51, 52, 63] Bisher fanden auf dieser Basis hergestellte Herzklappenprothesen zwar keine klinische Anwendung, konnten aber bereits im Tierversuch erprobt werden [45, 51, 85, 86].

Besiedelte Bioprothesen aus EZM-Bestandteilen wie Fibrin und Kollagen bilden ein biokompatibles und resorbierbares Gerüst. Die Matrices zeigen *in-vitro* und im Tiermodell jedoch schwache mechanische Eigenschaften. Gründe hierfür sind der deutlich geringere Anteil an EZM-Bestandteilen sowie die schwache Ausbildung einer gerichteten Faserstruktur im Vergleich zu nativen Prothesen. Bei Auswahl einer höheren Dichte an EZM-Proteinen kommt es zu eingeschränkter Zellinfiltration. Aufgrund derartiger Problematik wurden diese Prothesen bisher nicht im klinischen Alltag eingesetzt. Im Tiermodell konnte eine auf Fibrin basierende TEHV erprobt werden (*siehe Abb. 3.2; B*). [9, 87-89]

Der Einsatz von dezellularisierten, allogenen oder xenogenen Herzklappenprothesen konnte bereits im klinischen Umfeld erprobt werden. Die Implantation einer dezellularisierten, allogenen Pulmonalklappe im Jahr 2002 zeigte erste Erfolge und gute Langzeitergebnisse nach zehn Jahren [90, 91]. Dabei wurde die dezellularisierte Klappe mit vaskulären, autologen EC re-besiedelt, um eine athrombogene Oberfläche zu schaffen und das Risiko einer immunologischen Reaktion auf die subendotheliale Kollagenschicht zu reduzieren [91]. Aber auch für nicht-besiedelte, dezellularisierte Prothesen konnten vereinzelt klinische Erfolge verzeichnet werden [92]. Bestand aktueller Forschungen ist somit erstens die Frage nach Notwendigkeit einer Re-Zellularisierung. Zweitens stellt sich weiterhin die Frage nach einem optimalen Scaffold-Material. Xenogene Herzklappenprothesen (siehe Abb. 3.2; C) bergen das Risiko immunogener Reaktionen und der Übertragung zoonotischer Erkrankungen. So wurde der Gebrauch der Synergraft™-Prothese für den klinischen Einsatz im Jahr 2003 eingestellt [93]. Diese dezellularisierte Schweineherzklappe wurde in der Studie von Simon *et al.* in den Ausflusstrakt des rechten Herzens bei vier Kindern implantiert. Alle vier Klappen zeigten eine massive Degeneration und strukturelle Defekte aufgrund einer inflammatorischen und immunogenen Reaktion. Gründe hierfür sind der unvollständige Dezellularisierungsprozess vor Implantation sowie Kalzifizierungen [94]. So ergibt sich drittens auch die Frage nach der optimalen Dezellularisierungsmethode, um möglichst die strukturelle Integrität der Herzklappe zu erhalten gleichzeitig aber immunogene Antigene vollständig zu entfernen. [84, 95-98]

In den letzten Jahren konnten wegweisende Fortschritte in den Herstellungsmethoden einer TEHV erreicht werden mit dem Ziel einer weiteren Vereinfachung bestehender Konzepte. Klinisches Potenzial zeigten besonders die beiden Methoden nach dem *in-situ*- und *off-the-shelf*-Prinzip (*off-the-shelf* = engl. „von der Stange, gebrauchsfertig“). Die *in-situ*-Methode bietet den Vorteil einer raschen Implantation. Im Tiermodell konnte diese Vorgehensweise präklinisch erprobt werden [99]. Die Herstellung der TEHV beruhte auf Basis eines synthetischen, resorbierbaren Scaffolds besiedelt mit autologen Knochenmarkszellen. Zusammen mit der anschließenden, minimalinvasiven Implantation konnte der Pulmonalklappenersatz innerhalb weniger Stunden erfolgen. Aktuell wird die Beständigkeit dieser Herzklappenprothesen unter Hochdruckbedingungen analog des Körperkreislaufes erforscht [100]. Nachteilig des *in-situ*-Prinzips ist die Tatsache, dass dieses die Entnahme von autologen Zellen erfordert. Dies kann durch die *off-the-shelf*-Methode möglicherweise weiter vereinfacht werden. Dabei werden beispielsweise *in-vitro* hergestellte TEHV nach Bildung einer EZM dezellularisiert [89, 101]. Anschließend erfolgt eine Lagerung der zellfreien TEHV, welche bei Bedarf implantiert wird. *In-vivo* kommt es zur Re-Zellularisierung und Regeneration

der Herzklappe. Trotz des großen klinischen Potenzials gilt es zu beachten, dass dieses Konzept auf der Regenerationskapazität des einzelnen Patienten beruht, welches interindividuell variieren kann. [98]

Zunehmend gibt es eine Entwicklung hin zu minimalinvasiven Verfahren, bei welchen die Aortenklappenprothese Katheter-gestützt eingesetzt wird (TAVI = engl. transcatheter aortic valve im-plantation). Diese interventionelle Behandlung beschränkt sich aktuell auf die Anwendung bei älteren, inoperablen Hochrisikopatienten. Bei diesen Patienten reduziert die TAVI die operative Mortalität und stellt eine Alternative zum chirurgischen Eingriff dar. [102] Diese Katheter-gestützte Methode konnte bereits auch für die Implantation von TEHV erprobt werden [103].

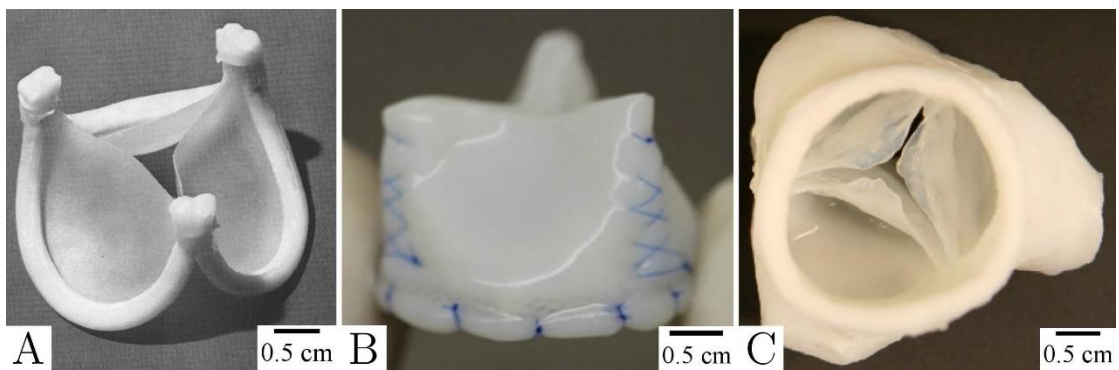


Abbildung 3.2: Scaffoldmaterialien für tissue-engineerte Herzklappen.

(A) Trikuspidale Klappe aus Polyurethan für den Aortenklappenersatz. [104]. (B) Biodegradable trikuspidale Klappe aus dezellularisiertem Fibrin. [89]. (C) Dezellularisierte Aortenklappe vom Schwein. [105].

### 3.4 Tissue Engineering von Gefäßen

Jährlich werden 800.000 aortokoronare Bypass-Operationen durchgeführt [106]. Trotz rückläufiger Operationszahlen im letzten Jahrzehnt [107-109] stellt sich die Frage nach einem alternativen Gefäßersatz vor allem für kleinlumige Gefäße wie Koronarien oder periphere Bein Gefäße. Ziel des Ersatzes erkrankter Gefäße besteht in der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Blutversorgung.

Zum Ersatz großlumiger Gefäße ( $> 6$  mm) werden in der Klinik bereits routinemäßig synthetische Gefäßprothesen verwendet (*siehe Abb. 3.3; A*). Hierfür etablierten sich erfolgreich nicht-abbaubare Materialien wie das Polyester Polyethylenterephthalat (PET, Dacron®) oder das Polymer Polytetrafluoroethylen (PTFE, Teflon®) bzw. das feinporigere, widerstandsfähigere ePTFE (expandiertes PTFE). Generell ergeben sich bei PET- und PTFE-Gefäßprothesen ähnliche Offenheitsraten [110-113]: Nach 5 Jahren sind in der aortoiliakalen Position 93% der PET- und 98% der PTFE-Prothesen durchgängig [113]. Bei Ersatz der femoropoplitealen Gefäße liegt diese Rate für beide Prothesentypen bei 43 - 45% und somit deutlich unter 77% Offenheitsrate für autologe Veneninterponate in der gleichen Position [112, 114, 115]. Die fehlende luminale EC-Schicht der PET- und PTFE-Prothesen resultiert besonders bei kleinkalibrigen Gefäßen ( $< 6$  mm) in frühen Gefäßverschlüssen. Dies lässt sich durch die hervorgerufene Reaktion des Körpers auf das Fremdmaterial erklären [116]. Eine luminale EC-Beschichtung von ePTFE-Prothesen kann deren Verwendung zum Ersatz von Koronarien ermöglichen [117]. Zudem zeigte die EC-Beschichtung von femoropoplitealen ePTFE-Gefäßprothesen vor Implantation deutliche Verbesserungen in der Offenheitsrate [118]. Weiterhin ist der Unterschied in der Elastizität zwischen PET-/PTFE-Gefäßprothesen und kleinkalibrigen, elastischen Arterien zu groß: PET und PTFE sind im Vergleich zu diesen Arterien zu steif und wenig compliant, sodass hieraus die geringere Offenheitsrate dieser Gefäßprothesen resultiert [119, 120]. Für den Ersatz kleinkalibriger Gefäße könnten daher PU-Gefäßprothesen eine vielversprechende Alternative darstellen. Grund hierfür ist, dass das PU nahezu identische elastische und mechanische Eigenschaften wie native, vor allem kleinkalibrige Arterien besitzt [119, 121]. Besiedelt mit autologen Endothelzellen und implantiert in die Karotiden von Hunden zeigten PU-Prothesen eine Offenheitsrate von 75% [122]. Durch diese tissue-engineerten PU-Prothesen könnte so *in-vivo* eine geringere Thrombogenität bei gleichzeitig guten elastischen Eigenschaften erreicht werden [123]. Es stehen noch klinische Anwendungen aus, um das volle Potenzial dieser Prothesen beurteilen zu können. [20, 116, 124]

Auf Basis von synthetischen, biodegradablen Polymeren hergestellte tissue-engineerte Gefäßprothesen zeigten bereits Erfolg im klinischen Einsatz [125]. Erstmals konnte im Jahr 2001 eine synthetische, resorbierbare, mit autologen Zellen besiedelte Gefäßprothese in der Pulmonalarterienposition eines vierjährigen Kindes erfolgreich implantiert werden. Eine nachfolgend größer angelegte Studie mit 25 Patienten im durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren bestätigte den Langzeiterfolg und das Wachstumspotenzial derart hergestellter Gefäßprothesen. [126-130] Der kleinkalibrige Gefäßersatz durch diese Prothesenart konnte außerdem erfolgreich im Tierversuch gezeigt werden [131]. Dabei wurden tubuläre PGA-Scaffolds mit allogenen Zellen besiedelt und *in-vitro* kultiviert. Während der Kultivierung degradierte das PGA-Scaffold und die Zellen bildeten EZM. Das EZM-Konstrukt konnte dezellularisiert und bis zur Implantation aufbewahrt werden (*off-the-shelf*-Prinzip). Vor Implantation kann eine Re-Besiedelung des EZM-Konstrukts erfolgen, was besonders beim kleinkalibrigen Gefäßersatz eine Reduktion der Thrombogenität bedeutet [131].

Neben den genannten synthetischen Materialien werden tissue-engineerte Gefäßprothesen aus biologischen Trägermaterialien entwickelt. Gefäßprothesen aus Biopolymeren wie Kollagen erzielten ähnliche Ergebnisse wie TEHV aus diesem Material. Die mechanischen Eigenschaften der Gefäßprothesen stellten sich *in-vitro* allerdings unzureichend dar [132]. Die Weiterentwicklung dieser Prothesen besserte zwar die mechanische Stabilität, im Tierversuch kam es jedoch in 50% zu Frühverschlüssen [133].

Dezellularisierte, azelluläre Gefäßprothesen allogener Herkunft zeigten im Tierversuch unzureichende Ergebnisse [134, 135]. Die Re-Besiedelung dieser Prothesen mit autologen Zellen und Implantation in die Karotiden vom Schwein ergab eine 71%ige Offenheitsrate nach vier Monaten [136]. Hierzu im Vergleich liegt die Offenheitsrate nach autologer Transplantation eines Karotissegments bei 100%. Die Versuche von *Teebken et al.* verdeutlichten die Relevanz einer autologen Zellularisierung von Gefäßprothesen (*siehe Abb. 3.3; B und C*). Die mögliche Verwendung xeno-gener, dezellularisierter und anschließend mit Heparin beschichteter Gefäßprothesen konnte in Tierversuchen gezeigt werden [137]. In einer Studie mit 183 Patienten ergaben dezellularisierte Rinder-Mesenterialvenen als Hämodialyse-Zugang vielversprechende Ergebnisse [138].

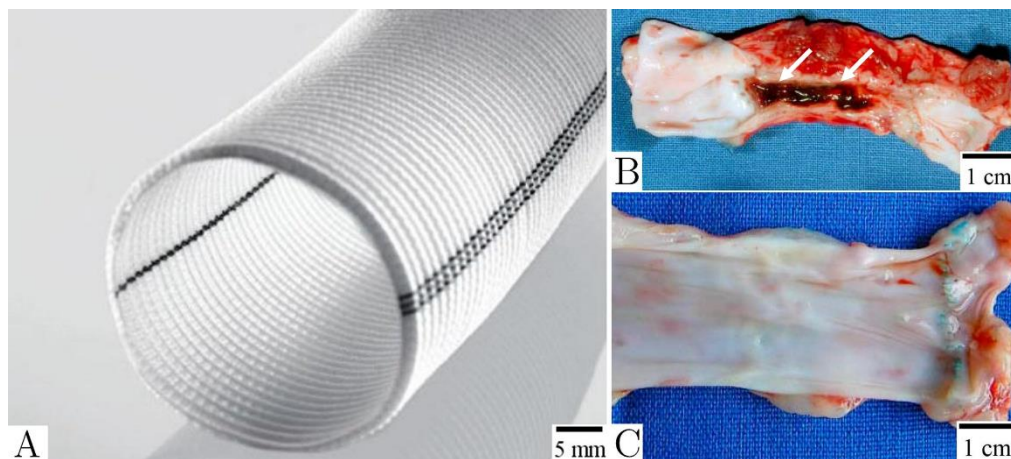


Abbildung 3.3: Beispiele des Gefäßersatzes.

(A) Gefäßprothese aus Polyester für den rekonstruktiven Ersatz der thorakalen Aorta, des Arcus aortae sowie der Aorta ascendens und descendens. [Uni-Graft® W, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER]. (B) und (C) Dezellularisierte Veneninterponate nach einer Woche in-vivo zeigen ohne EC-Besiedelung eine Thrombosierung des Gefäßlumens (Bild B, Pfeile). Nach autologer EC-Besiedelung ist eine glatte Oberfläche des Lumens erkennbar (Bild C). [64].

### 3.5 Tissue Engineering von Myokard

Abgestorbene Kardiomyozyten können vom Körper nicht ersetzt werden, da diese Zellen terminal differenziert sind und somit kein Regenerationspotenzial besitzen. Folge davon ist der narbige Umbau des abgestorbenen Areals, was die Herzfunktion einschränkt. Der Ersatz von abgestorbenem Herzmuskelgewebe könnte durch Methoden des TE entwickelt werden.

Dabei konnten unterschiedliche Ansätze nach den TE-Prinzipien erprobt werden. Ein Ansatz kombiniert Matrices aus biologischen Stoffen mit kardialen Myozyten [139]. Dabei zeigten die kardialen Zellen zwar gute Wachstumseigenschaften und nachweisbare kontraktile Aktivität *in vivo* im Tiermodell, aber das tissue-engineerte Konstrukt wurde nicht vollständig in das restliche Herzmuskelgewebe integriert [139]. In weiterführenden Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass mechanische und elektrische Stimulation die Differenzierung der kardialen Myozyten förderte [140]. Auch auf Basis von synthetischen, biodegradablen Materialien hergestellte Scaffolds [141, 142] sowie dezellularisierte, re-besiedelte Matrices [143] konnten im Tiermodell zur Herstellung von myokardialem Gewebe getestet werden. Im Hinblick auf Gewebeintegration, funktionelle Eigenschaften, immunologische Toleranz der tissue-engineerten Konstrukte sowie Auswahl des idealen Trägermaterials und Zelltyps bedarf es weiteren Erkenntnissen, um das klinische Potenzial dieser Konstrukte zu erfassen [36, 144-147].

---

## 4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl bereits tissue-engineerte Gefäß- und Herzklappenprothesen klinisch erprobt wurden, gibt es beispielsweise für myokardiales und pädiatrisches kardiovaskuläres Gewebe sowie für die Koronarien bisher noch keinen optimalen tissue-engineerten Ersatz [90, 91, 118, 146]. Herausforderungen ergeben sich in der Avitalität, Oberflächenthrombogenität, verminderten Robustheit und eingeschränkter Wachstumsfähigkeit des Ersatzes [38, 81]. Daher ist das Ziel die klinisch umsetzbare Entwicklung eines biokompatiblen, vitalen Konstrukts, welches *in-vivo* Bedingungen standhält und die Fähigkeit zum Wachstum besitzt. Um dies zu erreichen, bedarf es eines robusten Trägermaterials, einfach zu gewinnenden Zellen sowie Konditionierungsverfahren, die das Konstrukt auf die *in-vivo* Bedingungen vorbereiten. Zielsetzung dieser Arbeit war durch Variation der Besiedlungs- und Konditionierungsverfahren die Bildung einer extrazellulären Matrix als mögliches vitales Ersatzgewebe zu analysieren. Vitale Endothelzellen und Fibroblasten wurden auf ein Polyurethan-Trägermaterial besiedelt, wobei die Effekte der Endothelzellbesiedelung und des pulsatilem Flusses systematisch beobachtet und miteinander verglichen wurden. Entscheidend für die Bildung der extrazellulären Matrix war die Vitalität der Zellen sowie der pulsatile Fluss, welcher *in-vivo* Bedingungen imitiert und in einem speziell für diesen Versuchsaufbau entwickelten Bioreaktor erzeugt wurde. Das gebildete tissue-engineerte Konstrukt aus Trägermaterial, vitalen Zellen und extrazellulärer Matrix könnte so in Zukunft als autologes, kardiovaskuläres Ersatzgewebe dienen. Im Fokus dieser Dissertation stand die Optimierung der Bildung eines solchen Gewebes.



## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Isolation von Endothelzellen und Fibroblasten

Zur Gewinnung von EC und FB für nachfolgende Experimente wurden Reststücke eines Venenbypasses verwendet. Dieser Venenbypass entstammte Segmenten einer Beinvene (Vena saphena magna) und wurde bei Herz-Bypass-Operationen in der Abteilung der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (an den Standorten Klinikum Großhadern und Klinik Augustinum) eingesetzt. Um eine geeignete Länge des Bypasses zu gewährleisten, wurde bei der Entnahme des Venensegmentes sichergestellt, dass genügend Material zur Überbrückung der Gefäßstenose vorhanden war. Überschüssiges Gefäßmaterial konnte zu Forschungszwecken freigegeben werden, wofür die Genehmigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München vorlag. Nach präoperativer Aufklärung sowie freiwilliger, schriftlicher Einverständniserklärung des jeweiligen Patienten wurde das Material anonymisiert und an die Arbeitsgruppe übergeben (*siehe Anhang*). Die steril entnommenen Venenstücke lagerten bis zur möglichst zeitnahen Verarbeitung in Earle's Medium199 (M199, Biochrom AG, Berlin, GER) im Kühlschrank bei 4°C.

Vor Verwendung der Venen fand deren Begutachtung statt. Beschädigte sowie zu kurze (< 4 cm) Venen und eine Lagerungszeit von mehr als einer Woche stellten Ausschlusskriterien dar. Zunächst wurde von dem noch nicht behandelten Venensegment ein 0,5 - 1 cm langes Stück für die anschließende FB-Gewinnung abgetrennt und in M199 aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte vorerst die Isolation der EC in einem zweiseitigen, enzymatischen Prozess. Die verwendeten Lösungen wurden zuvor auf 37°C angewärmt. Nach Auswahl einer geeigneten Vene erfolgte deren einseitige Kanülierung. Die Kanüle wurde mit chirurgischem Nahtmaterial (Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, GER) sowie über eine Bulldog-Klemme in der Vene fixiert (*siehe Abb. 5.1*). Über den an der Kanüle angebrachten Dreiwegehahn (B. Braun Melsungen AG) konnte das Venenlumen in physiologischer Flussrichtung mit 15 - 30 ml „Spüllösung“ (M199 + 1% 10 mg Gentamycin/ml Invitrogen GmbH, Karlsruhe, GER, + 0,2% 5.000 I.E. Heparin/0,2 ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, GER) durchspült werden. Dieses Verfahren diente der Reinigung des Gefäßes und zur Entfernung von Blut- und Zellresten. Mit Hilfe einer Klemme erfolgte

dabei die Überprüfung auf Dichtigkeit durch einmaliges Auftreiben der Vene mit der „Spüllösung“ (siehe Abb. 5.1).

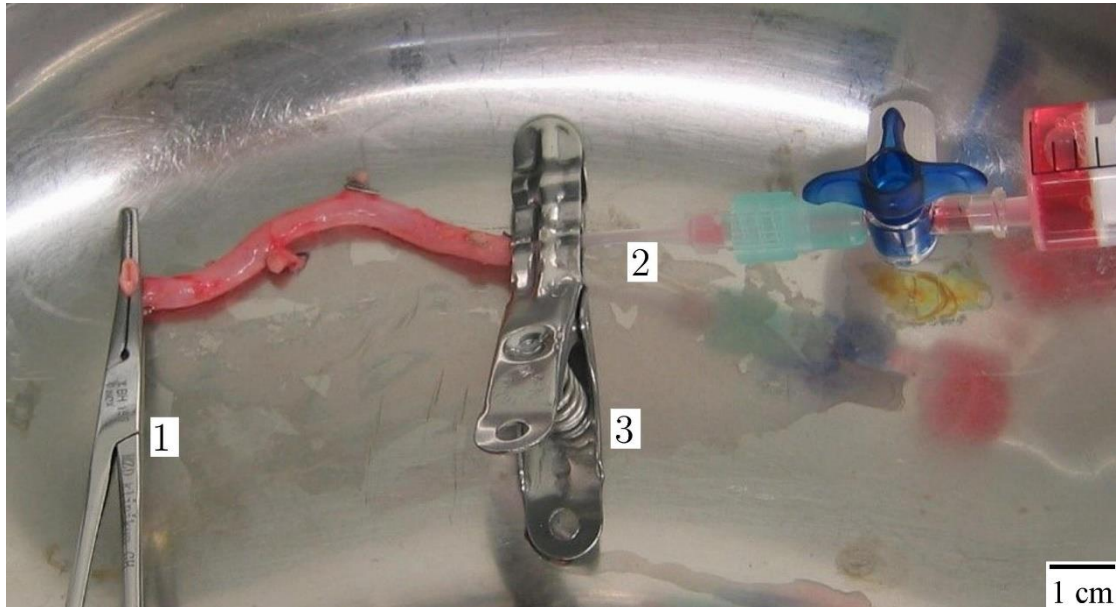


Abbildung 5.1: Einseitige Kanülierung des Venenstückes und Auftreiben mit der „Spüllösung“.

Zur Überprüfung der Dichtigkeit des Venenstückes wurde an einem Ende die Klemme (1) angebracht. Die Kanüle (2) und Bulldog-Klemme (3) am anderen Ende dienten der Spülung.

Im Folgenden wurde die Vene mit steriler „Kollagenaselösung“ befüllt (7 mg Kollagenase 300 U/mg, Worthington Biochemical Corporation/CellSystems GmbH, St. Katharinen, GER; gelöst in 10 ml 1%igem Humanem Serum Albumin, Baxter GmbH, Unterschleißheim, GER). Zum Schutz vor Austrocknung während der Inkubation lagerte die Vene in einem mit ca. 200 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom AG) gefüllten, geschlossenen Behälter. Die Kollagenase führte während der Inkubation von 15 min Dauer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zu der enzymatischen Ablösung der EC im Venenlumen. Anschließend stoppte das Durchspülen mit 30 ml „Stopplösung“ (M199 + 20% Fetal Calf Serum, Biochrom AG) die Kollagenasereaktion. Die Suspension aus „Stopplösung“ und abgelösten Zellen wurde direkt in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Die beschriebene Prozedur wurde ab dem Einbringen der „Kollagenaselösung“ wiederholt, sodass zwei Röhrchen mit Zellsuspensionen gewonnen werden konnten. Nach einer Zentrifugationsdauer von 5 min bei 500 G/min wurde der Überstand abpipettiert. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde in 4,5 ml EC-Medium (Promocell GmbH, Heidelberg, GER) gut resuspendiert und die Zellsuspension in eine 12,5 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt.

Die Isolation von FB erfolgte im Anschluss steril mittels der „Deckglasmethode“. Dabei wurden möglichst kleine Venenwandstücke zwischen zwei Kontaktflächen gesetzt. Dies gewährleistete den FB eine vergrößerte Wachstumsoberfläche (*siehe Abb. 5.2*) und begünstigte die Zellproliferation.

Ein Längsschnitt eröffnete das Venenlumen und weiteres Zerkleinern der Venenwand in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Gewebestücke folgte. Die Verarbeitung der Gewebestücke erforderte ein rasches Vorgehen, sodass das Gewebe nicht austrocknete. Auf den Boden einer Petrischale gesetzt, folgte das Abdecken der Gewebestücke mit einem an Silikontropfen haftenden Deckglas (*siehe Abb. 5.2*). Somit sollten die Gewebefragmente sowohl zum Boden als auch zum Deckel Kontakt haben. Die Petrischale (Durchmesser: 10 cm) wurde abschließend mit 10 ml FB-Medium (Promocell GmbH) befüllt.

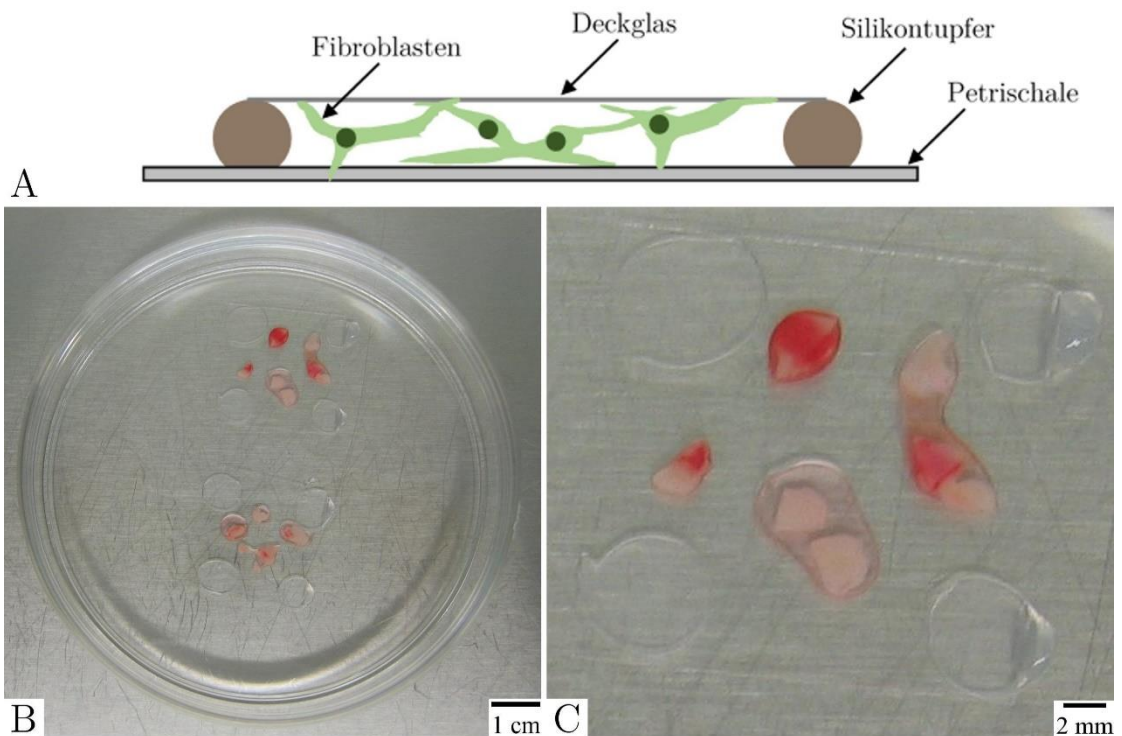


Abbildung 5.2: Deckglasmethode zur Gewinnung von FB.

(A) Schematische Darstellung des Wachstums von FB zwischen zwei Ebenen. (B) Übersichtsaufnahme einer Petrischale mit zwei Deckgläsern und darunterliegenden Venenstücken. (C) Nahaufnahme eines Deckglases aus B.

### 5.1.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Das Kulturmedium wurde drei Mal wöchentlich zur Hälfte erneuert. Zum Ausschluss einer mikrobiellen Kontamination und zur Beurteilung der Konfluenz fand bei jedem Mediumwechsel eine mikroskopische Begutachtung des Zellmediums und der Zellmorphologie statt. Jeglicher Zweifel an der Sterilität führte zum Verwerfen der Kulturflasche. Sobald > 90% des Bodens der Kulturflasche von Zellen bedeckt war, lag eine konfluente Zellschicht vor (*siehe Abb. 5.3*). Dies machte die zeitnahe Subkultivierung (Passagieren) der Zellkultur durch Trypsinieren notwendig, da die konfluente Zellschicht zur Verlangsamung der Proliferationsrate und zum Ablösen der Zellen führt. Bei Konfluenz verhielten sich die Zelllinien unterschiedlich. EC waren bei einer Zellschicht („mono-layer“) konfluent. Weiteres Hinauszögern des Passagierens hätte zum Ablösen der Zellen und zur Unbrauchbarkeit der Zellkulturflasche geführt. Demgegenüber wachsen auch FB in mehreren Schichten („multi-layer“).

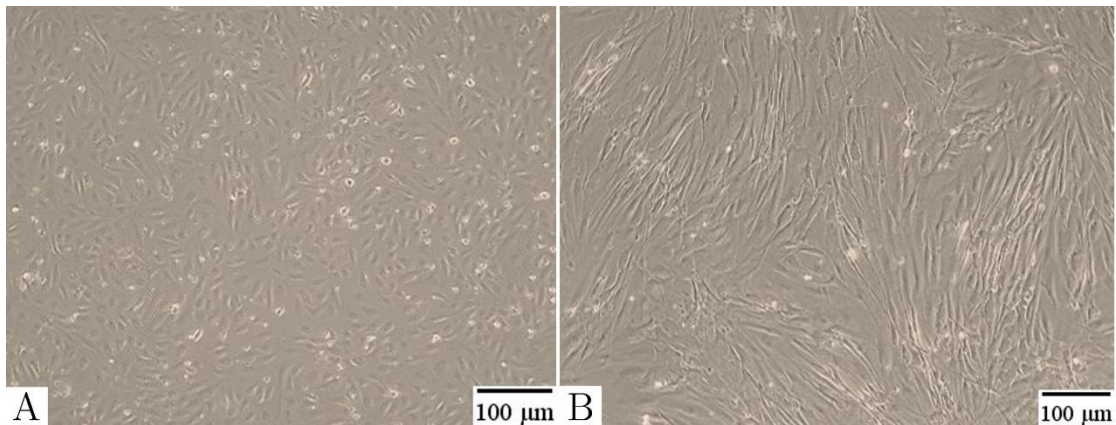


Abbildung 5.3: Phasenmikroskopische Aufnahmen von Zellkulturen in T175-Zellkulturflaschen.

(A) Konfluente EC-Zellschicht unter Ausbildung eines „mono-layers“. (B) Konfluente FB-Schicht.

Durch den Trypsinierprozess lösten sich die adhärenenten, konfluenten Zellen ab. Die enzymatische Reaktion basierte auf der Spaltung extrazellulärer Proteine. Dabei wurde der interzelluläre Kontakt getrennt und die Einzelzellen lagen in Suspension vor.

Zunächst erfolgte die Reinigung der inneren Oberfläche der Kulturflasche mittels PBS. Dadurch wurden abgelöste Zellen, Zellreste, Magnesium und FCS-haltiges Medium, welches den Trypsinierprozess beeinträchtigen würde, ausgewaschen. Danach konnte das Trypsin auf den Boden der Kulturflasche hinzugegeben werden. Das Trypsin führte während einer Inkubationszeit von 3 min (bei EC) bzw. 5 min (bei FB) im Brutschrank zur Zellablösung. Klopfen der Kulturflasche gegen

die Hand unterstützte das Ablösen. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung unter dem Lichtmikroskop bewirkte die Zugabe des in M199 verdünnten FCS (Mengenangaben *siehe Tabelle 5.1*) den Stopp der Reaktion. Durch mehrmaliges Pipettieren konnten die Zellen weiter vereinzelt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen werden. Die Zellsuspension wurde für die Dauer von 5 min bei 500 G/min zentrifugiert. Anschließend konnte das resuspendierte Zellpellet zur weiteren Proliferation auf eine größere Wachstumsfläche ausgesät bzw. zur Lagerung kryokonserviert werden.

Dokumentiert wurden die Zelllinie, deren Alter, die Passagenanzahl und der Zeitpunkt der Passage (*siehe Abb. 5.4*). Für die Versuche wurden EC aus der vierten Passage und FB aus der vierten bzw. fünften Passage verwendet. Die Dauer von der Isolation bis zur vierten Passage betrug durchschnittlich bei EC  $24 \pm 2$  Tage und bei FB  $40 \pm 3$  Tage. Die Lebendzellzahl bei Konfluenz in einer T175-Zellkulturflasche betrug für FB  $4,23 \pm 2,50$  Millionen und für EC  $4,81 \pm 2,50$  Millionen.

Die Volumina der verwendeten Reagenzien richtete sich nach der Größe der zu trypsinierenden Kulturflasche (*siehe Tabelle 5.1*).

Lösungen	Kulturflasche			
	T12,5	T25	T175	10 cm Petrischale
<b>PBS (1 - 2 min)</b>	6 ml	8 ml	14 ml	14 ml
<b>Trypsin 1:20<sup>a</sup> (EC: 3 min, FB: 5 min)</b>	1,5 ml	2 ml	5 ml	5 ml
<b>M199/FCS<sup>b</sup></b>	7 ml/2 ml	7 ml/2 ml	9 ml/5 ml	9 ml/5 ml
<b>Kulturmedium/Flasche</b>	4 ml	7 ml	30 ml	10 ml

Tabelle 5.1: Tabelle zur Veranschaulichung der Reagenzien beim Trypsinieren.

Die Lösungen sind mit Inkubationszeit in min und das Volumen ist in ml angegeben.

<sup>a</sup> Verdünnung in PBS 1:20

<sup>b</sup> Die FCS-Menge entspricht der zu stoppenden Trypsinmenge.

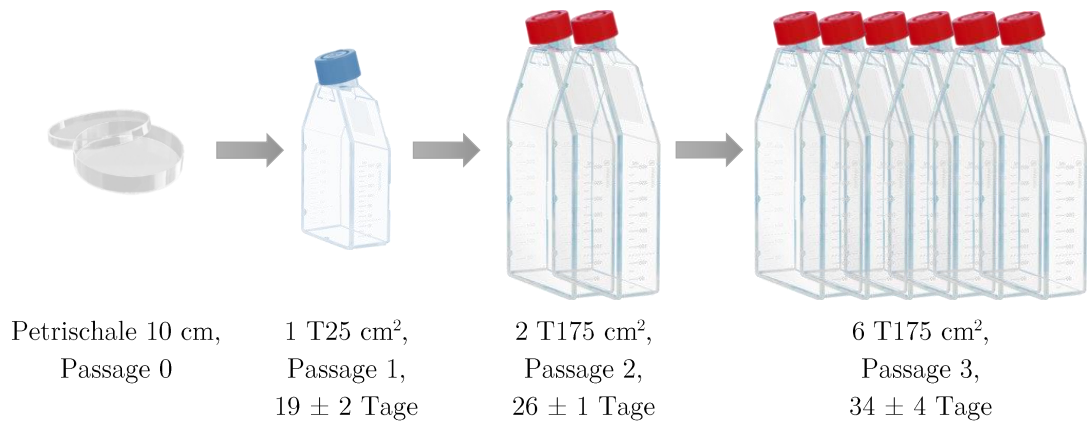
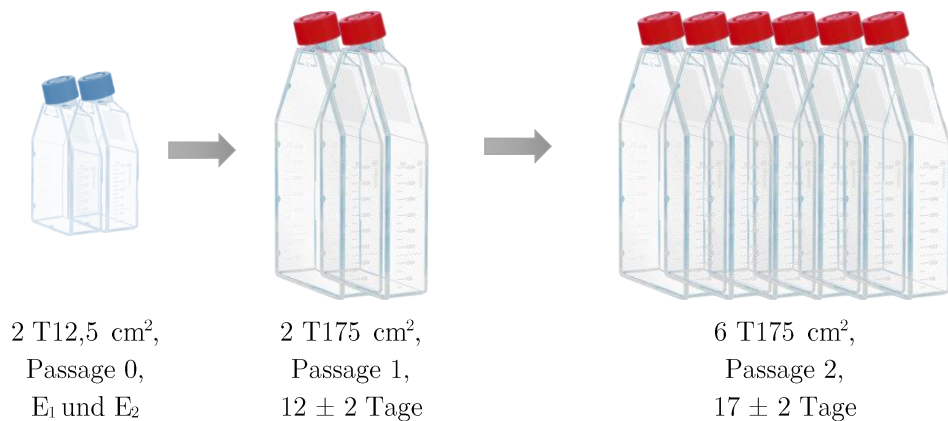
**Fibroblasten****Endothelzellen**

Abbildung 5.4: Darstellung des Schemas zum Passagieren von EC und FB.

Angegeben sind die Größe der Kulturflasche bzw. Petrischale und die Passagenanzahl sowie die durchschnittliche Dauer von der Isolation bis zur jeweiligen Passage. [Bilder modifiziert nach Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER].

**5.1.3 Kryopräservation**

Falls keine anschließende Verarbeitung der Zellen erfolgte, wurden die Zellkulturen nach dem Trypsinierprozess kryokonserviert. Das Zellpellet wurde dabei in einer Mischung aus 70% Kulturmedium, 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) aufgenommen. Da das flüssige DMSO zytotoxische Eigenschaften besitzt, sollte dieses erst nach der Resuspension des Zellpellets im Kulturmedium/FCS-Gemisch hinzugegeben werden. Nach Zugabe von DMSO und raschem Befüllen der Kryogefäße (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER) mit jeweils 1,5 ml konnten diese bei -80°C gelagert werden.

Beim Auftauprozess diene ein Gemisch aus 8 ml M199 und 4 ml FCS zum Auftauen des Inhalts eines Kryoröhrchens. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde zunächst im Wasserbad bei 37°C angetaut und durch anschließende Zugabe des M199/FCS-Gemisches vollständig gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 500 G/min für die Dauer von 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und danach in eine T175-Kulturflasche pipettiert.

## 5.2 Zellbesiedelung und Konditionierung

### 5.2.1 Aufbau des Polyurethan-Teflon-Gerüsts und Vorbereitung der Zellträger

Als Zellträger dienten synthetische PU-Scaffolds, welche auf Basis des elektrostatischen Spinnverfahrens (Elektrospinning) am Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV, Denkendorf, GER) hergestellt wurden. Durch Elektrospinning können Polymervliese mit einem Faserdurchmesser im Mikro- und Nanobereich produziert werden [148, 149]: Von einer Düse aus wurde eine Polymerlösung in ein elektrisches Feld gesprüht. Diese Lösung bestand aus PU gelöst in Chloroform. Unter Einfluss des Spannungsfeldes wurde die Polymerlösung auf eine gegenüber der Düse liegende Zylinderform bewegt. Nach Verdampfen des Chloroforms blieben die auf den Zylinder angelagerten PU-Fasern in Form des PU-Schlauches zurück. Der PU-Schlauch konnte von dem Zylinder gelöst und für anschließende Versuche verwendet werden. Bei der Auswahl der verwendeten PU-Schläuche wurde auf eine einheitliche Wanddicke (1 mm) und auf etwaige Schäden des Materials geachtet. Gemäß der *Abbildung 5.5; A* konnten aus den Schläuchen PU-Zylinder für die Besiedelung zugeschnitten werden.



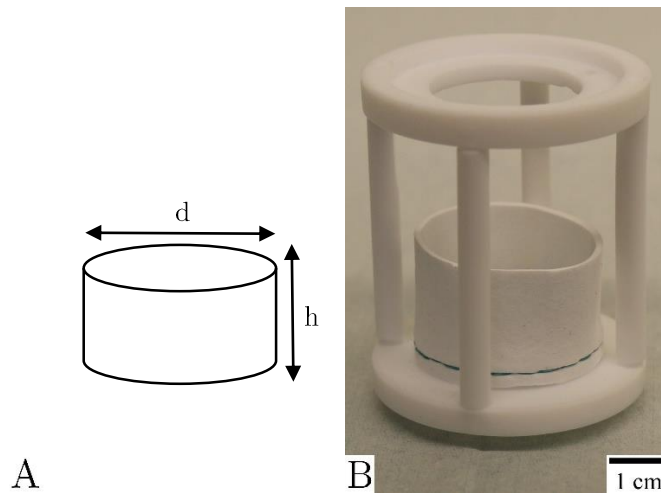


Abbildung 5.5: PU-Zylinder und PU-Teflonkonstruktion für die Besiedelung.

(A) Schematische Darstellung des PU-Zylinders. Innendurchmesser  $d = 3,3$  cm und Höhe  $h = 2,0$  cm des Zylinders (wobei ca. 0,5 cm durch das spätere Annähen verdeckt wurden). (B) Dargestellt ist der PU-Zylinder, welcher in dem Teflonerüst mittels Naht fixiert ist. Unter Versuchsbedingungen sind zwei PU-Zylinder in dem dargestellten Teflonerüst angebracht.

Unter unsterilen Bedingungen erfolgte das Einnähen der PU-Zylinder in die Teflonhalterung (siehe Abb. 5.5; B). Eine fortlaufende Naht mittels Supolene 3-0-Nahtmaterial (Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, GER) gewährleistete die Fixierung. Durch das Annähen des PUs an die Halterung wurden ca. 0,5 cm der Höhe des Zylinders verdeckt, folglich konnte mit einer Höhe von 1,5 cm pro Zylinder gerechnet werden. Das Teflonerüst bestand aus einem oberen und einem unteren Ring, welche über vier Teflonstäbe verbunden waren. An jeden Ring wurde ein PU-Zylinder angenäht, sodass an einer Teflonhalterung zwei PU-Zylinder befestigt waren.

Anschließend wurde die PU-Teflonkonstruktion mittels Formaldehydgas sterilisiert. In einem Vorversuch wurde die Beständigkeit der PU-Struktur gegenüber einer Gassterilisation untersucht (siehe Anhang).



### 5.2.2 Besiedelung

Die Besiedelung der PU-Zylinder mit FB (und EC) erfolgte vor den Konditionierungsprozessen. Dabei wurde pro Zellbesiedelung eine Teflonhalterung mit zwei PU-Zylindern sowie eine Zellzahl von 750.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche des PU-Materials benötigt. Die benötigte Zellzahl konnte in einem Vorversuch quantifiziert werden (*siehe Anhang*). Für die zu besiedelnde Innen- und Außenfläche von insgesamt  $31,10 \text{ cm}^2$  pro PU-Zylinder (Innendurchmesser  $d = 3,3 \text{ cm}$ ; Höhe  $h = 1,5 \text{ cm}$ ) ergab sich eine Zellzahl von 23 Millionen. Somit bedurfte es 46 Millionen Zellen (zwei PU-Zylinder) pro Besiedelungsvorgang. Bei der angenommenen Zellanzahl von 3 Millionen Zellen pro  $175 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche entsprach dies mindestens 15 Zellkulturflaschen pro Besiedelungsprozess. Unter Verwendung einiger Reserve-Kulturflaschen konnten die benötigten Zellkulturflaschen trypsiniert (*siehe 5.1.2 – Abschnitt Trypsinierprozess*) und das entstandene Zellpellet in möglichst wenig Kulturmedium resuspendiert werden.

Die Bestimmung der Zellzahl sowie eine Unterscheidung lebender und toter Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Einweg-Zählkammer C-Chip, Digital Bio, Korea über Biochrom AG). Dabei wurden  $10 \mu\text{l}$  Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung (0,4%ig, Sigma Aldrich Chemie GmbH) im Verhältnis 1:5 und 1:10 in einem Eppendorfröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, GER) verdünnt. Von jeder gut vermengten Verdünnung wurden umgehend jeweils  $10 \mu\text{l}$  in eine Zählkammer pipettiert, wobei Kapillarkräfte die Suspension vollständig in die Zählkammer zogen. Die lichtmikroskopische Zellquantifizierung erfolgte durch Auszählung und Beurteilung der Vitalität der Zellen. Hierbei erschienen vitale Zellen weiß und tote Zellen tiefblau, da diese den Farbstoff Trypanblau aufgrund einer defekten Zellmembran aufnahmen. Anhand der Quantifizierung der vitalen Zellen konnte das Volumen an Zellsuspension, welches für den Besiedelungsvorgang benötigt wurde, berechnet werden. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension ergab sich aus folgender Berechnung (*siehe Tabelle 5.2*): Gesamtzellzahl =  $\frac{\text{Zellzahl}}{4} \cdot F \cdot V \cdot K$

<b>Zellzahl</b>	Gesamtzellanzahl in vier Großquadraten; Zellzahl/4 ergibt den Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates
<b>F</b>	Verdünnungsfaktor mit Trypanblau-Lösung, bei 1:5 ist $F = 5$ , bei 1:10 ist $F = 10$
<b>V</b>	Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml
<b>K</b>	Kammerfaktor 10.000 (bezieht sich auf das Volumen eines Großquadrats)

Tabelle 5.2: Erläuterung der Formel.

Der Besiedelungszyylinder umfasste ein Gehäuse, welches oben und unten wasser- und luftdicht verschlossen werden konnte (*siehe Abb. 5.6; A*). Am Boden des Gehäuses gewährte eine rundliche Fassung ausgekleidet mit einer Silikonmembran Einsicht in das Zylinderinnere. Dies gewährleistete die möglichst luftdichte Befüllung des Zylinders sowie die Beurteilung des Füllungsdruckes. Der abnehmbare Deckel des Gehäuses war zur Befüllung des Zylinders mit einem Dreiwegehahn versehen. Ein Gummiring an der äußeren Seite des Bodens stellte den Kontakt zur Platte des Bioreaktors her.

Die Vorbereitung des Zellbesiedelungsvorgangs erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zuvor wurde der Besiedelungszyylinder dampfsterilisiert. Nach Einsetzen der gassterilisierten PU-Teflonkonstruktion in den Zylinder wurde zur Benetzung der inneren Oberflächen etwas Kulturmedium eingefüllt. Das zuvor berechnete Volumen der Zellsuspension, welches die gewünschte Zellzahl enthielt, wurde in den Zylinder pipettiert und dieser anschließend vollständig mit Kulturmedium über den Dreiwegehahn aufgefüllt. Dabei war zu beachten, dass der befüllte und geschlossene Besiedelungszyylinder möglichst wenig Luft einschloss, was über die Silikonmembran beurteilt werden konnte.

Der Besiedelungsbioreaktor (*siehe Abb. 5.6; B*) erlaubte eine dreidimensionale Besiedelung durch Rotation des Zylinders. Während einer Dauer von 24 Stunden alternierten eine statische Phase von 30 min mit einer rotierenden Phase von 2,5 min. Damit konnte sichergestellt werden, dass die Zellen sich von allen Seiten an das PU-Material anlagerten. Die statische Phase erlaubte ein Absetzen der Zellen auf dem PU-Material.

Nach Abschluss des Besiedelungsvorgangs konnte die Teflonhalterung mit beschichtetem PU-Material entnommen werden. Die im Kulturmedium verbliebenen Zellen, welche sich nicht an das PU-Material anlagerten, wurden ausgezählt (*siehe Anhang*). Somit konnten die auf dem PU-Material anhaftenden Zellen berechnet werden (*siehe Anhang*).

Nach Entnahme von Proben zur Kontrolle der Beschichtung folgte die dreitägige Ruhephase. Dabei lagerten die beschichteten PU-Zylinder in einem mit Kulturmedium gefüllten Becherglas.

Nach der dreitägigen Ruhephase erfolgte die Einteilung der Versuchsgruppen. Es wurden vier Gruppen G1 - G4 ( $n = 5$ ) festgelegt (*siehe Abb. 5.7*). Die PU-Zylinder von zwei Gruppen (G3 und G4) wurden zusätzlich mit EC für 24 Stunden besiedelt, gefolgt von einer statischen Kultivierungsperiode von drei Tagen. Nach den Beschichtungsprozessen wurden die PU-Zylinder für sieben Tage entweder statisch kultiviert oder dynamisch konditioniert.

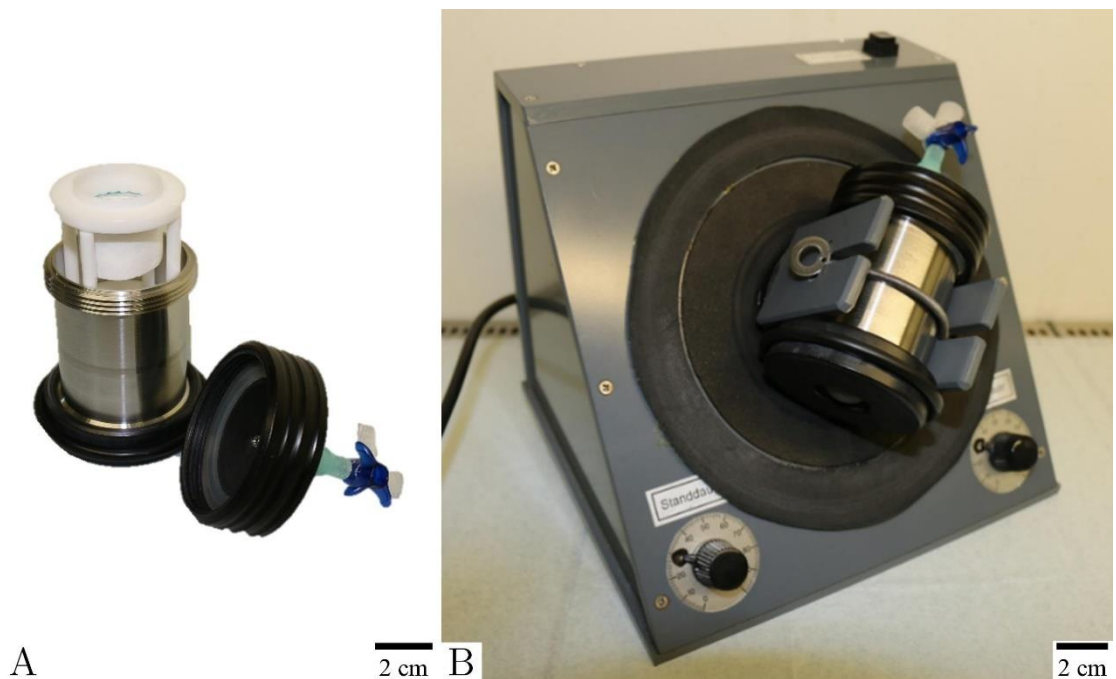


Abbildung 5.6: Besiedelungsbioreaktor.

(A) PU-Teflonkonstruktion im Besiedelungszyylinder. (B) Befüllter Besiedelungszyylinder im Besiedelungsbioreaktor.

### 5.2.3 Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppen G ( $n = 5$ )

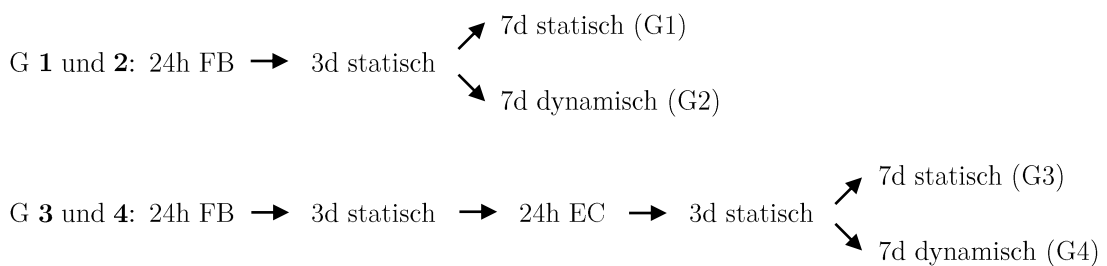


Abbildung 5.7: Einteilung der Versuchsgruppen G1 - G4 ( $n = 5$ ).

Der Stichprobenumfang in dieser Arbeit wurde mit  $n = 5$  festgelegt. Diese Festlegung basiert auf einem Kompromiss zwischen zeitlichem, materiellem sowie finanziellem Aufwand und einer Gruppengröße, von welcher statistische Aussagen abgeleitet werden können. Ziel war somit eine möglichst repräsentative Stichprobe zu erreichen bei gegebenen Restriktionen in der Forschungspraxis.

#### 5.2.4 Konditionierungsbioreaktor und Ablauf des Konditionierungsprozesses

Den Beschichtungsprozessen und der Ruhephase folgte je nach Gruppeneinteilung die statische Kultivierung oder dynamische Konditionierung der PU-Zylinder.

Für die dynamische Konditionierung wurde die PU-Teflonkonstruktion in einen Konditionierungsbioreaktor (*siehe Abb. 5.8; B*) eingespannt, welcher in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Medizintechnik der Technischen Universität München entwickelt und bereits für weitere Studien verwendet wurde [150].

Das Prinzip des Konditionierungsbioreaktors war, einen pulsatilen Fluss zu generieren, um möglichst physiologische Flussbedingungen nachzuahmen. Die auf dem PU-Material angesiedelten Zellen wurden so Scherstress ausgesetzt. Der Konditionierungsbioreaktor setzte sich aus drei Funktionskomplexen zusammen bestehend aus einer Steuereinheit am Computer zum Monitoring der Konditionierungsbedingungen, einer Antriebseinheit mit Pumpe zum Aufbau des pulsatilen Flusses und einer sterilisierbaren Konditionierungseinheit (*siehe Abb. 5.8; B*). Die Konstruktion des Bioreaktors erlaubte die längerfristige Konditionierung im Brutschrank unter kontinuierlicher makroskopischer Beobachtung und Kontrolle durch die Steuereinheit.

In der Konditionierungseinheit hatten die Zellen nur Kontakt zu atoxischen Materialien wie Acrylglas (Polymethylmethacrylat), Teflon® (Polytetrafluorethylen) und Gummi, sodass eine Zelltoxizität und Reaktion der Stoffe auszuschließen war. Für sterile Bedingungen war erstens die dichte Konditionierungseinheit und zweitens deren Gassterilisation notwendig. Die Konditionierungseinheit bestand aus einem dreiteiligen Aufbau. Der untere Teil stellte über einen Schlauch eine Verbindung zur Antriebseinheit her und war zum mittleren Teil über eine Silikonmembran getrennt. Der mittlere, mit Medium befüllte Teil umfasste die PU-Teflonkonstruktion, wobei die tubuläre PU-Struktur so fixiert wurde, dass der breitere, eingenähte PU-Anteil nach unten zeigte. Über Dreiwegehähne konnte ein steriler Mediumaustausch erfolgen. Der obere Teil der Einheit stellte über den mit Sterilfiltern versehenen Deckel eine Verbindung zur Umgebungsluft her und ermöglichte damit den Austausch von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>.

Die Antriebseinheit lenkte die Kolbenstange aus. Diese Auslenkung erzeugte einen wiederkehrenden Luftstoß/-sog, welcher über den Schlauch die Konditionierungseinheit erreichte. In der Konditionierungseinheit führte der Luftstoß/-sog zu dem Heben und Senken der Silikonmembran, was zu einem pulsatilen Fluss des im mittleren Teil befindlichen Mediums führte. Über die Steuereinheit am Computer konnte das Minuten- und Schlagvolumen durch Einstellung der Pulsfrequenz und der Auslenkung des Kolbens geregelt werden.

Die dynamische Konditionierung erfolgte für sieben Tage im Bioreaktor. Die Konditionierungseinheit konnte nach Sterilisation unter der „Lamina Flow“ steril montiert werden. Nach Einsetzen der PU-Teflonkonstruktion in den mittleren Teil der Konditionierungseinheit wurde diese mit 350 ml FB- oder EC-Medium befüllt und in den Brutschrank gesetzt. Anschließend wurden die Konditionierungs-, Antriebs- und Steuereinheiten miteinander verbunden. Die dynamische Konditionierung teilte sich in zwei Phasen auf. Während den ersten drei Tagen betrug die Pulsfrequenz 36 Schläge/min bei einer Flussrate von 690 ml/min. Ab dem dritten bis zum siebten Tag wurde die Pulsfrequenz auf 60 Schläge/min bei einer Flussrate von 2.100 ml/min erhöht. Das Schlagvolumen konnte somit von 19,2 ml auf 35,0 ml erhöht werden. Gleichzeitig konnte am dritten Tag die Hälfte des Zellmediums ausgetauscht werden (175 ml).

Für die statische Kultivierung inkubierte die PU-Teflonkonstruktion für sieben Tage in dem mit Medium befüllten, sterilen Becherglas (*siehe Abb. 5.8; A*). Nach Einfüllen von 350 ml FB- oder EC-Medium und Einsetzen der PU-Teflonkonstruktion konnte das Becherglas in den Brutschrank gesetzt werden. Nach drei Tagen wurde das Medium zur Hälfte ausgewechselt (175 ml).

Direkt im Anschluss an die Kultivierungsperiode wurde der pH-Wert unter Verwendung eines pH-Meters (WTW, Weilheim, GER) in den Medien des Konditionierungsbioreaktors sowie des Becherglases gemessen.

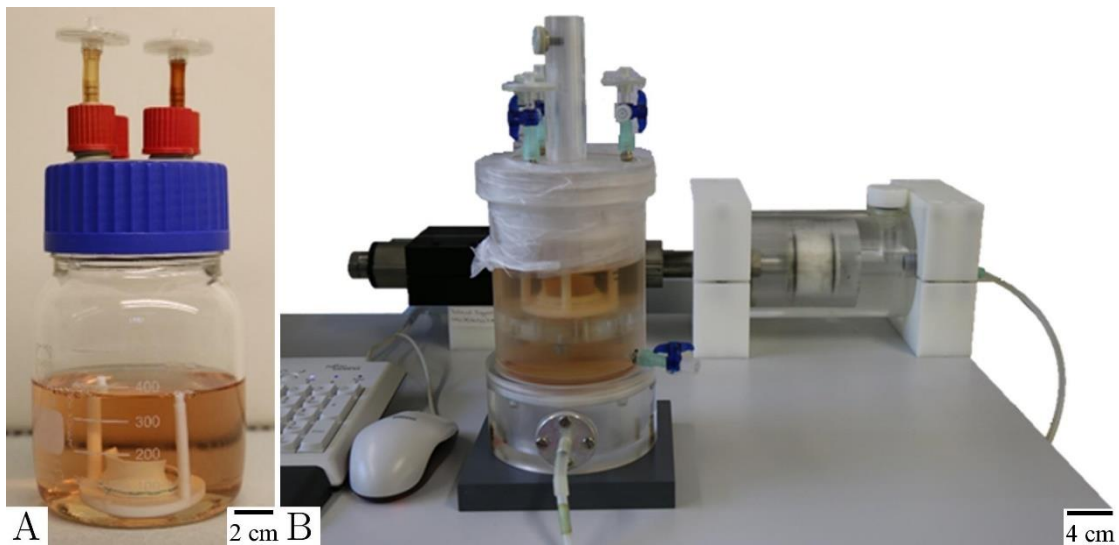


Abbildung 5.8: Statische Kultivierung und dynamische Konditionierung.

(A) Die statische Kultivierung für sieben Tage fand in einem mit Medium befüllten, sterilen Becherglas statt. Der Gasaustausch konnte über die am Deckel angebrachten Filter sichergestellt werden. In der Abbildung ist ein PU-Zylinder nach Probenentnahme im Zellmedium dargestellt. (B) Konditionierungsbioreaktor mit Pumpeinheit. Der von der Pumpe erzeugte Luftstoß/-sog wurde über einen Schlauch an die Membran in der unteren Einheit des Bioreaktors übertragen. Das Auslenken der Membran mobilisierte das darüber befindliche Medium. Daraus resultierte ein Heben und Senken des Mediums.

## 5.3 Rasterelektronenmikroskopie

### 5.3.1 Allgemeines

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dienen der Morphologiebeurteilung der Probenoberfläche.

Die REM ist eine bildgebende Methode, die Proben durch einen fokussierten Elektronenstrahl in hoher Auflösung darstellen kann. Um biologische Strukturen unter Erhalt deren Oberflächeneigenschaften abbilden zu können, bedarf es der Aufarbeitung der Proben. Diese müssen zunächst chemisch fixiert, anschließend entwässert, getrocknet und zur verbesserten Leitfähigkeit beschichtet werden, damit eine hohe Abbildungsqualität gewährleistet ist (*siehe Abb. 5.9*).

Die chemische Fixierung der Proben mittels Glutaraldehyd bewirkt die Konservierung der biologischen Strukturen, indem es die Proteine untereinander vernetzt und damit organische Prozesse stoppt. Somit bleibt die Beschaffenheit der Proben vom Zeitpunkt der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung und darüber hinaus stabil.

Die Entwässerung der Proben im Anschluss an die Fixierung kann mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgen. Im Vakuum des Rasterelektronenmikroskops würden wasserhaltige Proben durch die Verdampfung des Wassers beschädigt werden, weshalb die Proben entwässert und zunehmend mit Ethanol versetzt werden. Ethanol wird zudem angewandt, da es sowohl in Wasser als auch  $\text{CO}_2$  löslich ist.

Die Trocknung mittels Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT) gewährleistet die schonende Verarbeitung der Proben. Am kritischen Punkt besitzt ein Stoff sowohl in der flüssigen als auch in der gasförmigen Phase die gleiche Dichte. Beim Übergang zwischen den beiden Phasen am kritischen Punkt entstehen keine Oberflächenspannungen, welche das Material beschädigen könnten. Das flüssige Ethanol wird für diesen Prozess zunehmend durch Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) ersetzt, da Temperatur ( $243,1^\circ\text{C}$ ) und Druck (63,8 bar) von Ethanol am kritischen Punkt nicht praktikabel sind. Der kritische Punkt von  $\text{CO}_2$  liegt bei  $31^\circ\text{C}$  und 73,8 bar. Zunächst wird in der Druckkammer des KPT-Geräts nach vollständigem Austausch des Ethanols mit  $\text{CO}_2$  die Temperatur erhöht, wodurch sich auch der Druck erhöht. Sobald beide Werte oberhalb des kritischen Punktes liegen, liegt das  $\text{CO}_2$  flüssig und gasförmig vor. Anschließend wird der Druck bei gleichbleibender Temperatur langsam reduziert. Nach Erreichen des Umgebungsdruckes können die getrockneten Proben entnommen werden. Besonders bei zu rascher Drucksenkung kann es durch die beschleunigte Ausgasung zu Rissen in der Oberfläche der Proben kommen.

Nach Trocknung der Proben besitzen diese keine elektrische Leitfähigkeit mehr, weshalb die Beschichtung mit einem leitfähigen Stoff notwendig ist. Dabei wird die Oberfläche der Proben mit einer dünnen Schicht Gold besputtert. In dem Hochspannungsfeld werden Argonatome unter Vakuumbedingungen beschleunigt und ionisiert. Diese Ionen treffen auf die Goldkathode, aus welcher sie Goldatome herauslösen. In Form eines Goldnebels lagern sich diese Atome auf den Proben ab und bilden eine dünne, gleichmäßige Schicht auf der Probenoberfläche. Im REM werden aus der goldbeschichteten Oberfläche Elektronen gelöst, wodurch das kontrastreichere und schärfere Abbild entsteht.

Die Abbildung der Proben erfolgt am Rasterelektronenmikroskop, indem die aus der Probenoberfläche gelösten Elektronen detektiert werden. Zunächst werden Elektronen an der Glühkathode emittiert und in dem elektromagnetischen Feld beschleunigt. Durch Bündelung der emittierten, energiegeladenen Elektronen wird der Elektronenstrahl erzeugt. Dieser Elektronenstrahl wird rasterartig über die Probenoberfläche geführt, wobei Elektronen aus der Probenoberfläche gelöst

werden. Die Detektion dieser gelösten, sogenannten Sekundärelektronen (SE) ergibt das vergrößerte Abbild der Probenoberfläche.

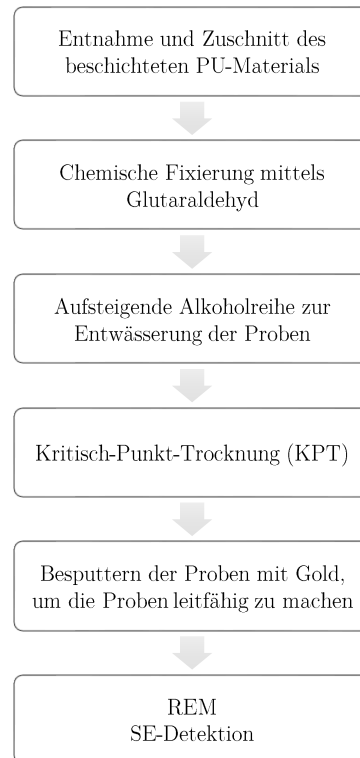


Abbildung 5.9: Prozess der Probenaufbereitung für die REM.

### 5.3.2 Fixierung der Proben

Nach Entnahme der Proben wurden diese anschließend in FIX-II-Lösung (aus 912 ml Ampuwa, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER; 86 ml Glutaraldehyd 25%, Sigma Aldrich Chemie GmbH; 11,3 g Natrium-Cacodylat Trihydrat, Sigma Aldrich Chemie GmbH; 1,5 ml HCl (1 N), Sigma Aldrich Chemie GmbH) fixiert. Bis zur weiteren Probenvorbereitung konnten die fixierten Proben bei 4°C in FIX-II-Lösung gelagert werden. Die Fixierungszeit betrug mindestens 1 - 2 Tage, um eine Fixierung der gesamten Dicke des Probenmaterials sicherzustellen.

### 5.3.3 Aufsteigende Alkoholreihe

Zur Entwässerung der Proben wurden diese mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen versetzt. Dabei schwammen die Proben jeweils 10 min bei Raumtemperatur in 30, 50, 70, 90 und 96%igem Ethanol. Nachfolgend wurden die Proben in gekühlten (-20°C) 99,9%igen Ethanol überführt.



### 5.3.4 Kritisch-Punkt-Trocknung

Die Proben wurden in den Innenraum der mit 99,9%igem Ethanol befüllten Kammer gesetzt und diese verschlossen. Nachdem die Temperatur innerhalb der Kammer auf 8°C gesunken war, ersetzte das eingebrachte, flüssige CO<sub>2</sub> schrittweise das Ethanol. Zwischen den einzelnen Durchgängen erfolgten Pausen von 1 - 2 min, damit das CO<sub>2</sub> in die Proben eindringen konnte. Während des gesamten Prozesses waren die Proben stets vollständig mit Flüssigkeit umgeben. Im Anschluss an den zehnten Durchlauf wurde die Kammer auf 42°C erwärmt, während der Druck zeitgleich auf ca. 80 bar anstieg. Nach Erreichen des kritischen Punktes von CO<sub>2</sub> lag dieses im flüssigen und gasförmigen Zustand vor. Über ein Ventil wurde das CO<sub>2</sub> langsam abgelassen und der Druck in der Kammer sank. Dieser Vorgang verlief kontrolliert über einen Zeitraum von ca. 60 min. Dem Trocknungsvorgang anschließend konnten die Proben auf Metallhalter befestigt werden. Dafür wurden die Proben zweigeteilt und eine Unter- und Oberseite auf einem Halter festgeklebt.

### 5.3.5 Sputtern

Die Goldbeschichtung der Proben erfolgte im Sputter Coater (Bal-Tec SCD 050, Bal-Tec GmbH, Witten, GER). Hierfür wurden die Probenhalter in die Kammer des Geräts eingesetzt und anschließend Luft gegen reines Argongas ausgetauscht. Nach Herstellung eines Vakkums in der Kammer erfolgte über einen Zeitraum von 180 s die Goldbeschichtung der Proben. Nach Belüftung der Kammer konnten die Proben entnommen werden.

### 5.3.6 REM-Bildgebung

Die mikroskopische Bildgebung fand im Rasterelektronenmikroskop statt (Zeiss evo LS10, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER). Nach Einsetzen der Proben in die Kammer des Mikroskops wurde ein Vakuum von  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar aufgebaut. Die Sekundärelektronen (SE) konnten über den SE-Detektor registriert werden. Die Darstellung und Analyse der Bilder erfolgte digital am Computer.

## 5.4 LD-, Immunfluoreszenz- und histologische Färbungen

### 5.4.1 Allgemeines

Um die Zellvitalität, Zellbeschichtung sowie die Ausbildung von EZM-Bestandteilen durch Kultivierungs- und Konditionierungsprozesse beurteilen zu können, wurden Live/Dead® (LD), Immunfluoreszenz- (IF) und histologische Färbungen durchgeführt.

Zur Erfassung der Zellvitalität wurde die LD-Färbung durchgeführt.

Die IF-Methoden dienen der mikroskopischen Darstellung von Zell- und Gewebestrukturen, wie Proteinen. Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Antigen-Antikörperreaktion. Dabei bindet ein Primärantikörper spezifisch an die nachzuweisenden Gewebebestandteile (Epitop). Ein Sekundärantikörper, welcher bei der IF mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, geht in der zweiten Inkubationszeit eine Bindung mit dem Primärantikörper ein. Durch diese Methode wird die Gewebestruktur indirekt dargestellt. EC konnten mit vWF- (von-Willebrand-Faktor) und FB mit TE7-Färbungen fluoreszenz-markiert dargestellt werden. Zum Nachweis von EZM-Proteinen erfolgten IF-Färbungen von Elastin und Fibronectin.

Die histologische Pikrosiriusrot-Färbung stellte den EZM-Bestandteil Kollagen dar.

### 5.4.2 LD-Färbung

Die LD-Färbung konnte direkt im Anschluss an die Probenentnahme durchgeführt werden. Da hierbei vitale und tote Zellen gleichermaßen angefärbt werden sollen, war eine Probenfixierung in Formalin nicht notwendig, sondern würde zu einem Absterben aller vitaler Zellen führen. Nach einer kurzen Lagerung in M199 zur Vermeidung des Austrocknens der Probe konnte diese in einer 12-Well-Platte (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER) platziert werden. Die Färbung erfolgte mittels der Farbstoffe Syto9 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER) für vitale Zellen und Propidiumjodid (Sigma Aldrich Chemie GmbH) für tote Zellen. In 0,5 ml EC-Medium konnten 0,5 µl Syto9 und 1 µl Propidiumjodid verdünnt werden. Die Farbstoff-Mischung wurde direkt auf die PU-Probe gegeben, welche unverzüglich unter dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER) dargestellt wurde. Dabei erfolgte eine Begutachtung beider Oberflächen des PU, um etwaige Unterschiede zu erkennen: Die Innenseite stellte die konkave Seite, die Außenseite die konvexe Seite des PU-Zylinders dar.

### 5.4.3 Probenfixierung

Für die IF- und histologischen Färbungen wurden die Proben nach Entnahme umgehend in 4%iger Formalinlösung (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER) fixiert und darin bis zur weiteren Verarbeitung mindestens 1 - 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Somit konnte eine ausreichende Fixierung des Probenmaterials gewährleistet werden.

### 5.4.4 Schnittpräparation

Um mikroskopische Dünnschnitte anfertigen zu können, bedarf es einer Einbettung der Proben in geeignetes, schneidbares Material wie Paraffin (*siehe Abb. 5.10*). Die fixierten Proben wurden in Einbettkassetten gelegt und für die Dauer von 2 min in filtriertem Hämalaun (Carl Roth GmbH) angefärbt. Diese Färbung erleichterte die nachfolgende Handhabung durch die Markierung der Proben im farblosen Paraffinblock. Das Einbettmedium Paraffin (Carl Roth GmbH) ist hydrophob, weshalb zunächst eine Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe und Inkubation in Xylol (Carl Roth GmbH) erfolgte. Xylol lässt sich sowohl in Alkohol als auch Paraffin lösen und eignete sich als Zwischenmedium. Das Paraffin wurde zusammen mit der Probe in die Gussform gegeben und erstarrte anschließend bei Raumtemperatur. Die in den Paraffinblöcken enthaltenen Proben konnten folgend am Mikrotom geschnitten werden. Die Schnitte wurden in einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt und aus dem mittleren Teil der Probe entnommen. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte im Wasserbad gestreckt und auf mit Eiweiß eingestrichene Objektträger gezogen. Die Schnitte trockneten anschließend bei 40°C im Wärmeschrank für 24 Stunden.

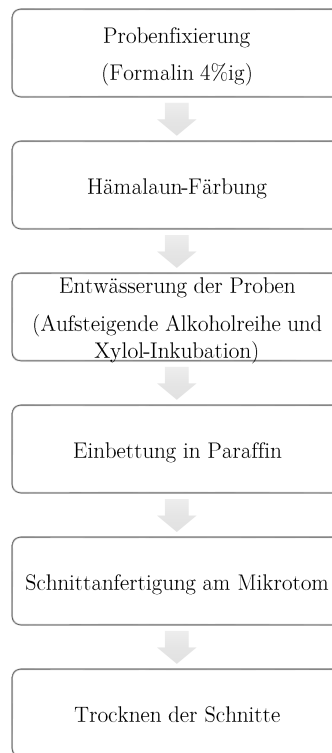


Abbildung 5.10: Ablauf der Probenvorbereitung für IF- und histologische Färbungen.

#### 5.4.5 Immunfluoreszenz

Vor den Färbungsprozessen mussten die Schnitte mittels Xylol entparaffiniert werden, da das hydrophobe Paraffin die Antikörperbindungsstellen (Epitope) blockieren würde. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Wärmeschrank bei 50°C (Schmelzen des Paraffins) sind die Schnitte für 30 min in Xylol inkubiert worden. Anschließend erfolgte die Wässerung der Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%). Dabei inkubierten die Schnitte pro Alkoholkonzentration zweimal je 4 min. Die Schnitte konnten abschließend in Ampuwa vom restlichen Alkohol gewaschen und in PBS gepuffert werden.

Nach der Entparaffinierung wurden die Zellmembranen mittels der Detergensenlösung aus 10% FCS, 2% bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma Aldrich Chemie GmbH) und 0,5% TritonX-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH) in PBS permeabilisiert. Dies erfolgte bei Raumtemperatur über eine Dauer von 30 min. Damit konnten im Färbeprozess die Antikörper in das Zellinnere gelangen. Ein Waschvorgang mit PBS reinigte anschließend die Schnitte von FCS.

Durch die initiale Formalinfixierung wurden Proteine quervernetzt, was zur teilweisen Veränderung der Epitope bzw. Antigene geführt hat. Damit die Antikörper in der Färbung die Gewebsantigene erkannten, mussten letztere freigelegt bzw. demaskiert werden. Hierfür wurde bei den

einzelnen Färbungen unterschiedlich demaskiert. Die Antigen-Demaskierung bei Proben zur Detektion von Elastin und Fibronectin erfolgte mittels Proteinase K (Dako GmbH, Glostrup, DK) für 6 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Zur Detektion von TE-7 wurde mit erhitzter EDTA-Lösung (0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, 10 µl ml in 5 ml Ampuwa) bei einem pH-Wert von 8 und zur Detektion von vWF mit erhitztem Citratpuffer (450 ml Acqua destillata + 41 ml 0,1 M Natriumcitrat Dihydrat, Sigma Aldrich Chemie GmbH + 9 ml Zitronensäure, Carl Roth GmbH) bei einem pH-Wert von 6 für jeweils 14 min demaskiert. Nach einem kurzen Waschgang in PBS inkubierten die Schnitte in 10% FCS und 4% BSA in PBS für 15 min zur Inaktivierung des Demaskierungsprozesses. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über 24 Stunden bei 4°C: Anti-Elastin (Abcam plc, Cambridge, England), Anti-Fibronectin (Sigma Aldrich Chemie GmbH), Anti-TE-7 (Anti-FB, Millipore Corporation, MA, USA) und Anti-vWF (Anti-von-Willebrand-Faktor bzw. Anti-EC, Sigma Aldrich Chemie GmbH) wurden jeweils in PBS mit 10% FCS und 4% BSA im Verhältnis 1:200 angewandt. Zur Darstellung der Antigen-Antikörperkomplexe konnte am Folgetag nach einem Waschgang mit PBS von 15 min der Sekundärantikörper aufgetragen werden. Da diese Antikörper mit dem fluoreszierenden Stoff gekoppelt sind, welcher unter Lichteinfluss an Leuchtintensität abnimmt, wurde während den folgenden Arbeitsschritten im Dunkeln gearbeitet. Die Sekundärantikörper Esel-Anti-Maus IgG H&L Alexa Fluor 555 (Abcam plc, Cambridge, England) für Elastin und TE-7 sowie Ziege-Anti-Kaninchen IgG H&L CF488A (Sigma Aldrich Chemie GmbH) für Fibronectin und vWF wurden im Verhältnis 1:200 in PBS mit 10% FCS und 4% BSA verdünnt. Die Schnitte inkubierten für 90 min bei Raumtemperatur. Gefolgt von dem Waschgang in PBS wurden die Zellkerne unter Verwendung einer DAPI-Gebrauchslösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH), 1:1000 in PBS verdünnt, angefärbt. Anschließend an den Waschvorgang mit PBS konnte mit Hilfe einer Sudanschwartz-Lösung (0,3% Sudanschwartz, Carl Roth GmbH, in 70% Ethanol) das Hintergrundleuchten reduziert werden. Im Anschluss an das Eindecken der Objektträger (Mounting Medium, Ibbi GmbH, München, GER) wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

#### 5.4.6 Histologische Färbung

Der Nachweis von Kollagen erfolgte histologisch mittels der Pikrosiriusrot-Färbung (Färbekit von Morphisto GmbH, Frankfurt, GER). Hierbei wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen. Nachdem die Schnitte im Wärmeschrank bei 50°C für 30 min inkubierten, wurden sie mit Xylol

entparaffiniert. Die Wässerung der Schnitte konnte anschließend mit der absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 60%) und dem Spülschritt in Ampuwa erreicht werden. Zunächst wurden mittels eines Färbevorgangs in Weigerts Eisenhämatoxylin die Zellkerne angefärbt. Waschschritte in destilliertem und nicht-destilliertem Wasser dienten der Spülung und Bläuung. Im Anschluss inkubierten die Schnitte eine Stunde im Pikrosiriusrot-Färbemittel. Abschließend erfolgten Spülgänge in 30%iger Essigsäure und eine Entwässerung mit 96%igem Ethanol, Isopropanol und Xylol. Schließlich wurden die Objektträger mittels Eindeckmedium (Leica GmbH, Wetzlar, GER) und Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co .KG, Braunschweig, GER) eingedeckt. Über das Lichtmikroskop Leica DMR, der Farbkamera Leica DC200 und dem Bildverwaltungsprogramm Leica Image Manager 50 ließen sich die Schnitte darstellen und dokumentieren.

## 5.5 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

### 5.5.1 Allgemeines

Die Methode der rt-PCR wurde angewandt, um die relative Menge bestimmter EZM-Proteine zu definierten Zeitpunkten zu ermitteln. Über Quantifizierung der amplifizierten cDNA (complementary DNA) können Rückschlüsse auf die Syntheseaktivität der Zelle und Expression bestimmter Proteine gezogen werden.

Nach Isolation der intrazellulären RNA aus dem Probenmaterial und der Transkription von RNA in einsträngige, stabilere cDNA konnte die Amplifikation der cDNA mittels PCR erfolgen.

Die Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente ist mittels des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green I möglich, welcher sich an Doppelstrang-DNA anlagert. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 494$  nm absorbiert die DNA-Farbstoff-Verbindung blaues Licht und emittiert grünes Licht bei  $\lambda = 521$  nm. Da das Fluoreszenzsignal mit der Menge an Doppelstrang-DNA korreliert, kann über den Zeitverlauf der PCR eine Zunahme der Fluoreszenz verzeichnet werden.

Die Analyse der cDNA-Amplifikation liefert idealerweise einen charakteristischen Verlauf: Nach den reaktionsträgen ersten Zyklen der PCR wird ab einer bestimmten Zyklenzahl ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals verzeichnet. Dabei überschreitet die Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz. Diese Schnittstelle zwischen gemessener Fluoreszenz und Hintergrundfluoreszenz korreliert mit einer bestimmten Anzahl an Replikationszyklen. Der Zyklus, ab welchem

die exponentielle Zunahme an Fluoreszenz zu verzeichnen ist, ist der sogenannte Threshold oder Ct-Wert (Ct = engl. cycle threshold; Schwellenwert-Zyklus). Der Ct-Wert ist quantifizierbar und dient als Rohwert der weiteren Berechnung. Im weiteren Verlauf der PCR überschreitet die Menge der Produkte die der Edukte und die Reaktion sistiert. Somit ist nur in der zweiten Phase, der exponentiellen Zunahme an DNA, die Reaktion quantifizierbar.

Gemessen wurden Parameter des EZM-Aufbaus wie  $\alpha$ 1-Kollagen Typ I,  $\alpha$ 1-Kollagen Typ IV, Elastin, Fibronectin1,  $\alpha$ 1-Laminin und Hyaluron-Synthase2. Weiterhin konnten Inflammationsparameter wie Interleukin-1a und Interleukin-8 erfasst werden. Als Referenz dienten GAPDH und  $\beta$ -Actin als sogenannte „Housekeeping-Gene“. Diese Gene werden konstant in der Zelle exprimiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale von Ziel-DNA zu GAPDH ermöglicht eine Einschätzung der Syntheseleistung der Zelle für die gesuchten Parameter.

### 5.5.2 Probenverarbeitung und Lagerung

Die entnommenen Proben wurden in Kryogefäße (Nunc GmbH) gelegt und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.5.3 RNA-Isolation

Die Isolierung von RNA aus den gefrorenen Proben erfolgte mithilfe eines RNA-Isolierkits (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, GER; Protokoll RNeasy Plus Mini Handbook, 09/2010, S. 17 - 22). Um die intrazellulär gelegene RNA für nachfolgende Prozesse zugänglich zu machen, war zunächst die Lyse der Zellmembranen notwendig. Dies konnte mit dem Lysepuffer erreicht werden, welchem 2-Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH) und Reagent DX Antifoam (Qiagen GmbH) zugesetzt wurden. Das Probenmaterial wurde mit dem Lysepuffer versetzt und gut gemischt. Das entstandene Lysat aus Pufferlösung, Zellen und Zellbestandteilen wurde anschließend unter Durchführung mehrerer Waschschriffe gereinigt, sodass die RNA befreit von Zellresten vorlag.

Im Anschluss wurde die RNA in Wasser eluiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration im Photometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf AG) wurde die RNA in Tris-HCl-Puffer gelöst. Durch die Konzentrationsbestimmung konnte bei der nachfolgenden Umschreibung der RNA in cDNA für jede Probe eine definierte Menge RNA eingesetzt werden. Die Reinheit der RNA konnte über die Messung des Verhältnisses photometrischer Absorption (260 nm zu 280 nm) ermittelt

werden. Zusätzlich erfolgte eine Qualitätskontrolle der RNA mittels Gelelektrophorese (*siehe Anhang*). Die gereinigte RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für maximal einen Tag gelagert.

#### 5.5.4 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA (reverse Transkription) wurde möglichst rasch nach der RNA-Isolation durchgeführt, da die instabile RNA durch RNasen abgebaut wird. Hierfür wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen (RT<sup>2</sup> First Strand Kit, Qiagen GmbH; Protokoll RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Handbook, 06/2013, S. 27/28). Die einzusetzende Menge an RNA-Lösung konnte mithilfe der Konzentrationsbestimmung berechnet werden. Pro Probe wurde  $0,8\ \mu\text{g}$  RNA verwendet. Zunächst wurde die RNA-Menge mit dem Puffer GE versetzt und bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um DNA-Reste zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung der RNA durch Inkubation der RNA in einem Reverse-Transkription-Mix bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 15 min und folgend bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 min. Die nun einsträngig vorliegende, in Wasser verdünnte cDNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

#### 5.5.5 Real-Time PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte nach Herstellerprotokoll (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Handbook, 06/2013, S. 38 - 41). Die Auswahl der zu bestimmenden Genen und den entsprechenden Primern wurde kundenspezifisch festgelegt. Zur Vorbereitung wurden der 2xRT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen GmbH) mit der aufgetauten cDNA-Lösung sowie RNase freiem Wasser angesetzt. Der Mastermix bestand aus Nukleotiden, SYBR Green I Fluoreszenzfarbstoff, ROX Referenzfarbstoff, Taq-Polymerase und PCR-Puffer. Der ROX-Farbstoff ermöglicht auftretende Fehler im Verarbeitungsprozess wie Pipettierfehler auszugleichen und diese Veränderungen zu normalisieren. Pro PCR-Tube konnte eine cDNA-Menge von  $20\ \mu\text{l}$  eingesetzt werden. Nach Aktivierung der hitzestabilen Taq-Polymerase bei einer Temperatur von  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 min folgte der Amplifikationsprozess. Dieser Prozess umfasste insgesamt 40 Zyklen, wobei während einem Zyklus zunächst die Doppelstrang-DNA bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 15 s in Einzelstränge getrennt wurde. Bei anschließend  $60^{\circ}\text{C}$  für 30 s erfolgte die Anlagerung der Primer an komplementäre Sequenzen des DNA-Einzelstranges sowie die Amplifikation des DNA-Stranges. Die Primer markierten dabei den spezifischen, zu amplifizierenden Bereich, indem sie als Startpunkt für DNA-polymerisierende Enzyme dienten. Anschließend begann ein weiterer Zyklus. Die Analyse des PCR-Vorgangs konnte durch die Detektion der Fluoreszenzsignale über die Zyklenanzahl erfasst werden. Die Zahlenwerte wurden mittels der von *Livak et al.* beschriebenen Methode analysiert [151].



## 5.6 Auswertung

### 5.6.1 Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie der LD-, IF- und histologischen Färbungen erfolgte semiquantitativ. Hierfür wurde eine Einteilung in die Kategorien deutlich vorhanden (++), vorhanden (+) und nicht vorhanden (-) vorgenommen (*siehe Tabellen 6.1 bis 6.5*). Die mikroskopische Begutachtung und folgend semiquantitative Einteilung der Proben wurde anonymisiert, verblindet und individuell von drei wissenschaftlichen Mitarbeitern durchgeführt.

### 5.6.2 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mithilfe des ungepaarten t-Tests bei ungleichen Varianzen und einseitiger Testung. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Topographische Auswertung

#### 6.1.1 Unbeschichtetes Polyurethan

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbeschichtetem PU-Material dienten als Kontrollgruppe zum Vergleich mit besiedeltem PU.

Das unbeschichtete PU zeigt eine gleichmäßige, netzartige Oberfläche von poröser Beschaffenheit. Vereinzelt sind Ansammlungen der Fasern zu sehen, welche produktionstechnisch bedingt durch das Aufsprühen der Fasern entstehen können. In hoher Auflösung stellen sich die quervernetzten, feinen Fasern dar, welche in Länge und Durchmesser ( $6,47 \pm 2,01 \mu\text{m}$ ) variieren. Die Fasern zeigen keine Ausrichtung in eine bestimmte Richtung (*siehe Abb. 6.1*).

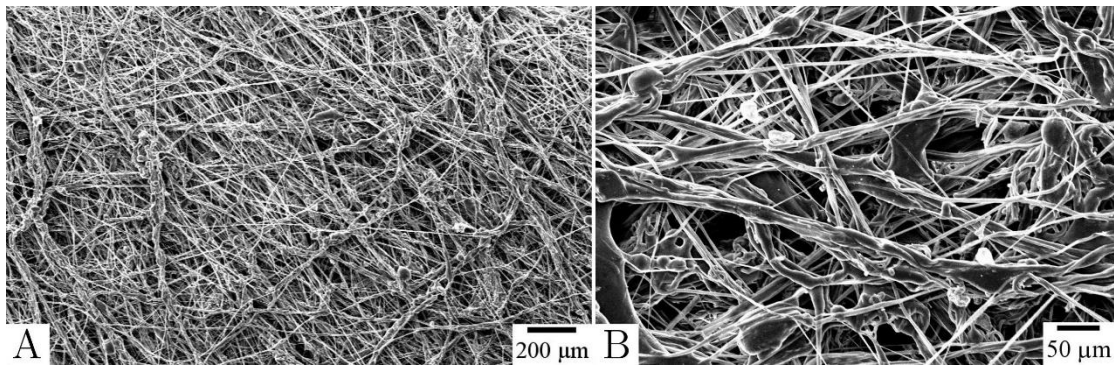


Abbildung 6.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbeschichtetem PU-Material.

(A) Die Oberfläche des PUs stellt sich netzartig mit poröser Textur dar. Die ungerichteten Fasern sind gleichmäßig verteilt und untereinander vernetzt. (B) Feine, größenvariante Fasern mit vereinzelt, produktionsbedingten Ansammlungen.

### 6.1.2 Polyurethan-Scaffolds nach Zellbesiedelung

Nach der Besiedelung mit FB und anschließender dreitägiger Ruhephase ist die PU-Oberfläche von einer konfluenten Zellschicht bezogen (*siehe Abb. 6.2; A*). Die FB sind gleichmäßig verteilt und zu einem ebenen Überzug verbunden, sodass die faserige PU-Oberflächenstruktur nicht mehr erkennbar ist. Allenfalls ist das Oberflächenrelief des PU-Materials zu sehen, an welches sich die FB-Schicht angepasst hat (*siehe Abb. 6.2; B*). Die Zellen zeigen keine Ausrichtung. Einzelne Risse in der Zellschicht-Oberfläche sind höchst wahrscheinlich durch die Kritisch-Punkt-Trocknung (*siehe 5.3.4*) bedingt.

Nach zusätzlicher Besiedelung mit EC ist ebenfalls eine konfluente Zellschicht vorhanden. Die Oberfläche wird gleichmäßig von EC bedeckt und es sind weder darunterliegende FB-Anteile noch PU-Faserstrukturen sichtbar. Die Textur der EC-Oberfläche unterscheidet sich wesentlich von einer FB-Zellschicht. Generell erscheint die EC-Oberfläche glatter (*siehe Abb. 6.2; C*). Morphologisch erkennbar und charakteristisch für eine EC-Zellschicht ist deren Anordnung in dem sogenannten „Kopfsteinpflaster“-Relief (*siehe Abb. 6.2; D*). Die Zellen zeigen keine Ausrichtung. Wiederum zeigen sich vereinzelt Risse in der Oberfläche, welche wahrscheinlich durch die Kritisch-Punkt-Trocknung (*siehe 5.3.4*) hervorgerufen wurden.

Generell kann bei vereinzelt, FB-besiedelten Proben beobachtet werden, dass die FB eine Affinität zur Innenseite des PU-Zylinders haben. An der Außenseite des PU-Zylinders ist nach der Besiedelung mit FB und anschließender dreitägiger Ruhephase keine Konfluenz mehr zu erkennen (*siehe Abb. 6.2; E und F*). Die FB sind einzeln zu differenzieren und lagern sich an die PU-Fasern an. Die PU-Faserstruktur ist hier deutlich zu sehen. Diese Beobachtung kann durch Beurteilung der Innen- und Außenseite des PU-Zylinders in den LD-Färbungen bestätigt werden.

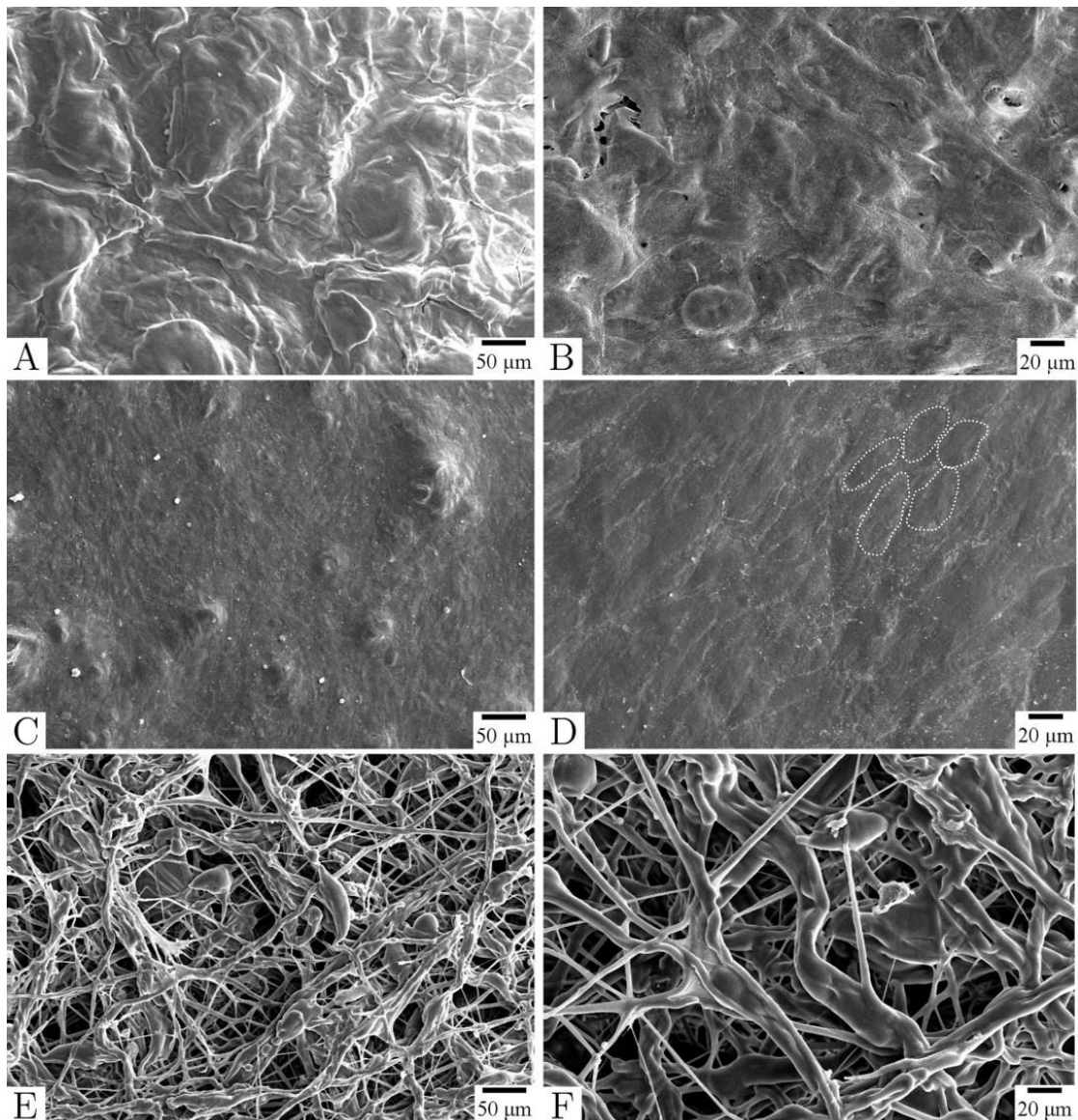


Abbildung 6.2: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach dem Zellbesiedlungsprozess.

(A und B) Nach 24 Stunden FB-Besiedelung mit anschließender dreitägiger Ruhephase ist eine konfluente, intakte FB-Schicht zu erkennen. Es zeigt sich keine Ausrichtung oder Anordnung der Zellen. Ein Riss in der Zellschicht ist durch den Trocknungsprozess bei der Verarbeitung der Proben bedingt. (C und D) Nach zusätzlicher EC-Besiedelung und dreitägiger Ruhephase ist ebenfalls eine konfluente Zellschicht zu sehen, welche das charakteristische Pflastersteinrelief der EC aufweist (Bild D, weiße Umrandungen). Die Zellen zeigen weder eine Ausrichtung noch Anordnung. Einzelne weiße Punkte auf der Oberfläche können als Detritus identifiziert werden. (E und F) Die Außenseite mancher FB-besiedelten Proben nach dreitägiger Ruhephase ist nicht von einer konfluente FB-Schicht bedeckt. Einzelne Zellen lagern sich an die PU-Fasern an und die PU-Struktur ist sichtbar.

### 6.1.3 Polyurethan-Scaffolds nach statischer Kultivierung

Nach FB-Besiedelung und statischer Kultivierung (G1) zeigt sich eine konfluente Zellschicht mit morphologisch charakteristischen spindelförmigen FB. Die Zellschicht erscheint insgesamt kräftiger und dichter als nach alleinigem Besiedelungsprozess, sodass in der Übersichtsaufnahme die PU-Oberflächenkonturen nicht mehr zu sehen sind (*siehe Abb. 6.3; A*). Die Oberfläche ist eben und das PU-Material gleichmäßig von Zellen bezogen. Es finden sich keine Zellakkumulationen. Die Zellen zeigen keine Ausrichtung; haben sich aber FB-typisch wirbelartig aneinandergelagert (*siehe Abb. 6.3; A und B*).

Nach zusätzlicher EC-Besiedelung mit anschließender statischen Kultivierung (G3) ist ebenfalls eine konfluente Zellschicht auszumachen (*siehe Abb. 6.3; C*). Die Oberfläche ist vom kopfsteinpflasterartigen Relief der EC geprägt (*siehe Abb. 6.3; D*) und erscheint insgesamt glatter als nach alleiniger FB-Besiedelung (*siehe Abb. 6.3; E*). Es lassen sich keine Oberflächenkonturen des PUs erkennen, was auf eine kompakte, kräftige Zellschicht schließen lässt. Die Zellen sind gleichförmig verteilt und weisen keine Ausrichtung auf.

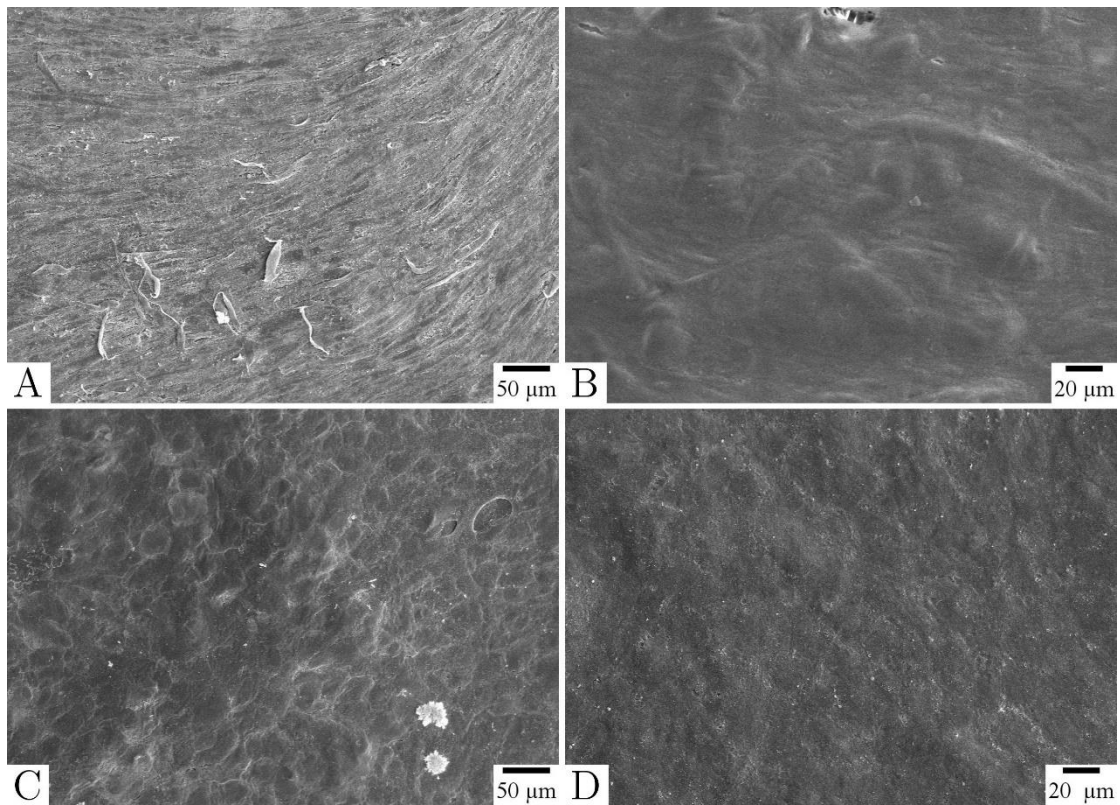


Abbildung 6.3: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach sieben Tagen statischer Kultivierung (G1 und G3).

(A und B) Nach alleiniger FB-Besiedelung und anschließend statischer Kultivierung (G1) ist eine konfluente Zellschicht vorhanden. Als morphologisches Korrelat der FB ist deren wirbelförmige Aneinanderlagerung besonders in Bild A zu erkennen. Die Oberflächenkonturen der PU-Fasern sind nicht mehr auszumachen. Die Zellen richten sich nicht in eine bestimmte Richtung aus. Im Vergleich zu alleiniger Besiedelung erscheint die Zellschicht deutlich ausgeprägter, da die PU-Konturen verstreichen. Vereinzelt sind Detritus (Bild A) sowie trocknungsbedingte Risse der Oberfläche (Bild B) zu identifizieren. (C und D) Auch nach statischer Kultivierung mit vorangehender FB- und EC-Besiedelung (G3) ist eine konfluente Zellschicht zu sehen. Diese erscheint als lückenlose Bedeckung der gesamten PU-Strukturen, sodass auch hier keine PU-Oberflächenkonturen sichtbar sind. Das morphologisch charakteristische Pflastersteinrelief der EC ist deutlich zu identifizieren. Die Zellen zeigen weder eine Ausrichtung noch eine bestimmte Anordnung. Vereinzelt ist Detritus zu sehen (Bild C).

#### 6.1.4 Polyurethan-Scaffolds nach dynamischer Konditionierung

Bei der Analyse der dynamisch konditionierten Proben (G2 und G4) wurde die Innen- und Außenseite des PU-Scaffolds separat betrachtet. Folgende Ausführungen beziehen sich auf die Innenseite des konditionierten PU-Scaffolds, da nur diese Seite dem pulsatilen Fluss ausgesetzt war.

Die FB-besiedelten Proben mit anschließender dynamischer Konditionierung (G2) weisen eine intakte, konfluente Zellschicht auf (*siehe Abb. 6.4; A und B*). Es sind keine Zellakkumulationen sichtbar und die Oberfläche erscheint glatt. Die spindelförmigen FB sind zu einer ebenen Oberfläche verbunden und bedecken vollständig das PU-Material, dessen Konturen vereinzelt erkennbar sind. Eine Orientierung der FB in Flussrichtung ist nicht zu beobachten.

Auffällig ist jedoch, dass vereinzelte Proben aus der Versuchsgruppe mit ausschließlicher FB-Besiedelung (G2) stellenweise ein großflächiges Ablösen der Zellen aufweisen (*siehe Abb. 6.4; C*). Die Zellschicht ist hier nicht mehr intakt und damit nicht konfluent, sodass die PU-Netzstruktur deutlich zu sehen ist. Einzelne abgrenzbare FB lagern sich an die PU-Fasern an (*siehe Abb. 6.4; C, Pfeil*). Wiederum können abgelöste Zellen an der Oberfläche identifiziert werden, wobei die kugelige Zellform auf abgestorbene Zellen schließen lässt (*siehe Abb. 6.4; D, Pfeil*).

Die Oberfläche der EC-besiedelten Proben mit anschließender dynamischer Konditionierung (G4) stellt sich ebenfalls konfluent dar. Sie zeigt die EC-typische kopfsteinpflasterartige Textur und wirkt insgesamt gleichmäßig (*siehe Abb. 6.4; E und F*). Die EC scheinen vital, da sie eine kompakte Zellschicht bilden und abgelöste Zellen nicht zu sehen sind. An einigen Stellen ist eine flussbedingte Ausrichtung der Zellen erkenntlich (*siehe Abb. 6.4; E, Pfeile*).

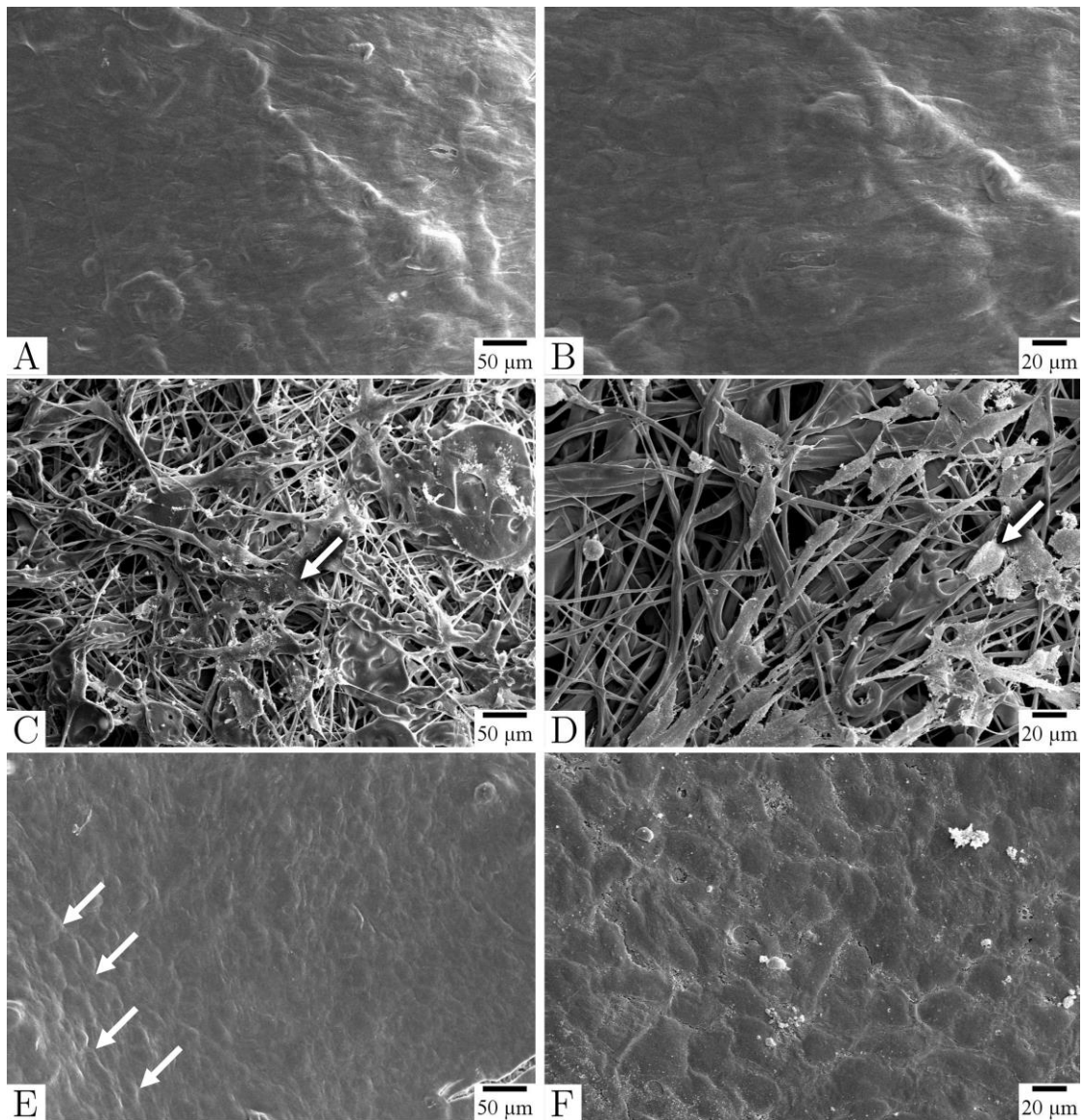


Abbildung 6.4: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Innenseite des PU-Zylinders nach sieben Tagen dynamischer Konditionierung (G2 und G4).

(A und B) Bei FB-besiedelten, dynamisch konditionierten PU-Zylindern (G2) ist bei der Mehrheit der Proben eine konfluente, intakte Zellschicht vorhanden. Die Schicht erscheint mit ebener Oberfläche; zellbedeckte PU-Faserstrukturen sind vereinzelt zu sehen. Eine flussbedingte Ausrichtung der Zellen ist nicht erkennbar. (C und D) Vereinzelte Proben der FB-besiedelten PU-Zylinder (G2) zeigen auf der Innenseite ein Ablösen der Zellen. Flussbedingt haben sich die FB an manchen Stellen großflächig abgelöst, sodass PU-Strukturen wieder sichtbar sind. Noch haftende FB (Bild C, Pfeil) sowie abgelöste Zellen (Bild D, Pfeil) sind an der Oberfläche darzustellen. (E und F) Die EC-besiedelten Proben zeigen nach sieben Tagen dynamischer Konditionierung (G4) eine konfluente, ebene Zellschicht mit EC-typischem Pflastersteinrelief. Die dynamische Konditionierung führte zu einer Ausrichtung der EC in Flussrichtung (Bild E, Pfeile). Einzelne verarbeitungsbedingte Risse (Bild E) sowie Detritus (Bild F) sind identifizierbar.



Zellen	Besiedelung		Statische Kultivierung		Dynamische Konditionierung	
	FB	FB+EC	FB	FB+EC	FB	FB+EC
Konfluenz	+	+	+	+	-	+
Zellfragmente	-	-	-	-	+	-
Ausrichtung	-	-	-	-	-	+

Tabelle 6.1: Überblick der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

(+) vorhanden, (-) nicht vorhanden.

## 6.2 Zellvitalität

### 6.2.1 Immunzytologie

Immunzytologische Färbungen dienen der Prüfung auf Reinheit der isolierten FB- und EC-Zellkulturen bzw. der Identifikation etwaiger Mischkulturen. Eine FB-Reinkultur exprimiert ausschließlich TE-7 und kein vWF (siehe Abb. 6.5; A). Bei alleiniger Expression von vWF konnte eine EC-Reinkultur angenommen werden (siehe Abb. 6.5; B). Die Expression von beiden Zellmarkern würde eine Mischkultur bestätigen, welche bei den für die Versuche verwendeten Zellkulturen ausgeschlossen werden konnte. Die DAPI-Färbung gegen DNA bestätigte das Vorhandensein von Zellen.

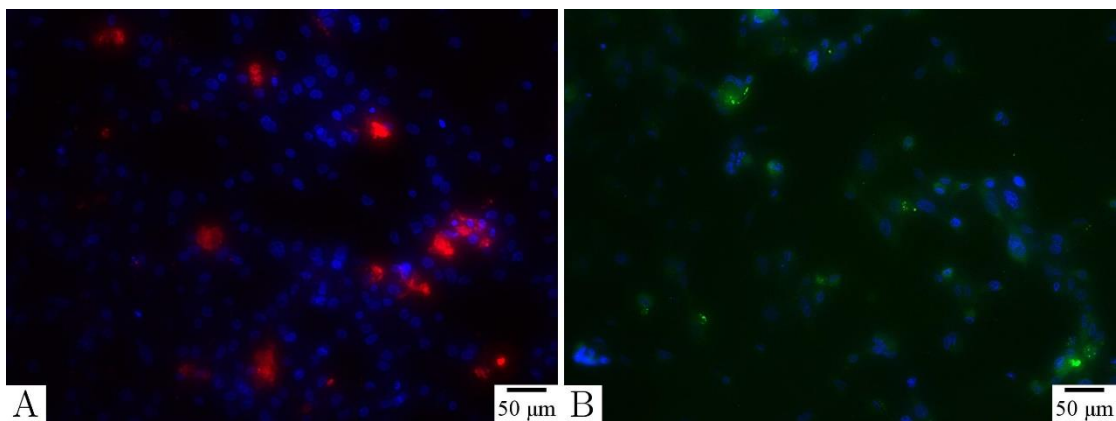


Abbildung 6.5: Repräsentative fluoreszenzzytologische Aufnahmen gegen TE-7 (FB-spezifischer Marker, rot), vWF (EC-spezifischer Marker, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).

(A) Die positive, in diesen Aufnahmen rote Farbreaktion gegen TE-7 bestätigt das Vorhandensein von FB. (B) vWF-Antikörper beweisen das Vorkommen von EC, welche hier grün dargestellt sind.

### 6.2.2 LD-Färbungen

Die fluoreszierenden Farbstoffe Syto9 und Propidiumiodid liefern Aussagen zur Vitalität der Zellen, wobei vitale Zellen grün und tote Zellen in den Abbildungen rot dargestellt werden.

Nach FB-Besiedelung ist die Mehrheit aller Zellen vital (*siehe Abb. 6.6; A*). Gemäß der typischen spindelförmigen Morphologie erscheinen die FB länglich mit prominenter, grüner Anfärbung. Eine wirbelförmige Anordnung der FB lässt sich erahnen, eine konkrete Ausrichtung kann nicht beobachtet werden. An einigen Stellen ist die Multilayer-Schichtung der FB erkennbar, da einige Zellen übereinander liegen. Wenige tote Zellen, welche gleichmäßig auf dem PU-Scaffold verteilt sind, können identifiziert werden.

Bei zusätzlicher EC-Besiedelung finden sich rundliche, gleichförmige Zellen, die ebenfalls kräftig grün angefärbt sind und einen vitalen Zellüberzug widerspiegeln (*siehe Abb. 6.6; C*). Eine Orientierung und Akkumulation der Zellen zeigt sich nicht. Die dicht aneinandergelagerten EC bedecken die darunterliegende FB-Zellschicht und nur vereinzelt lässt sich die wirbelförmige Orientierung der FB vermuten. Die toten EC weisen eine homogene Verteilung auf dem PU-Material auf. Allerdings können tote Zellen vermehrt beobachtet werden im Vergleich zu alleiniger FB-Besiedelung.

Bereits direkt nach den Besiedelungsvorgängen kann ein geringer Unterschied in der Verteilung der Zellen an der Innen- und Außenseite des PU-Scaffolds beobachtet werden. An der Innenseite sind die vitalen und toten Zellen gleichmäßig verteilt und bilden eine ebene Zellschicht. Die Außenseite des PU-Scaffolds ist weniger dicht besiedelt und bei einzelnen Proben liegt eine ungleichmäßige Zellverteilung vor. Der Unterschied in der Zellverteilung zwischen Innen- und Außenseite des PU-Zylinders ist besonders in den ausschließlich mit FB-besiedelten Proben zu erkennen. An der Außenseite sind die FB einzeln abgrenzbar und die Zellschicht ist nicht deckend (*siehe Abb. 6.6; B*). Bei EC-besiedelten Proben ist an der Außen- im Vergleich zur Innenseite kein Unterschied in der Zellschicht erkennbar (*siehe Abb. 6.6; D*). Diese Beobachtung kann in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden.

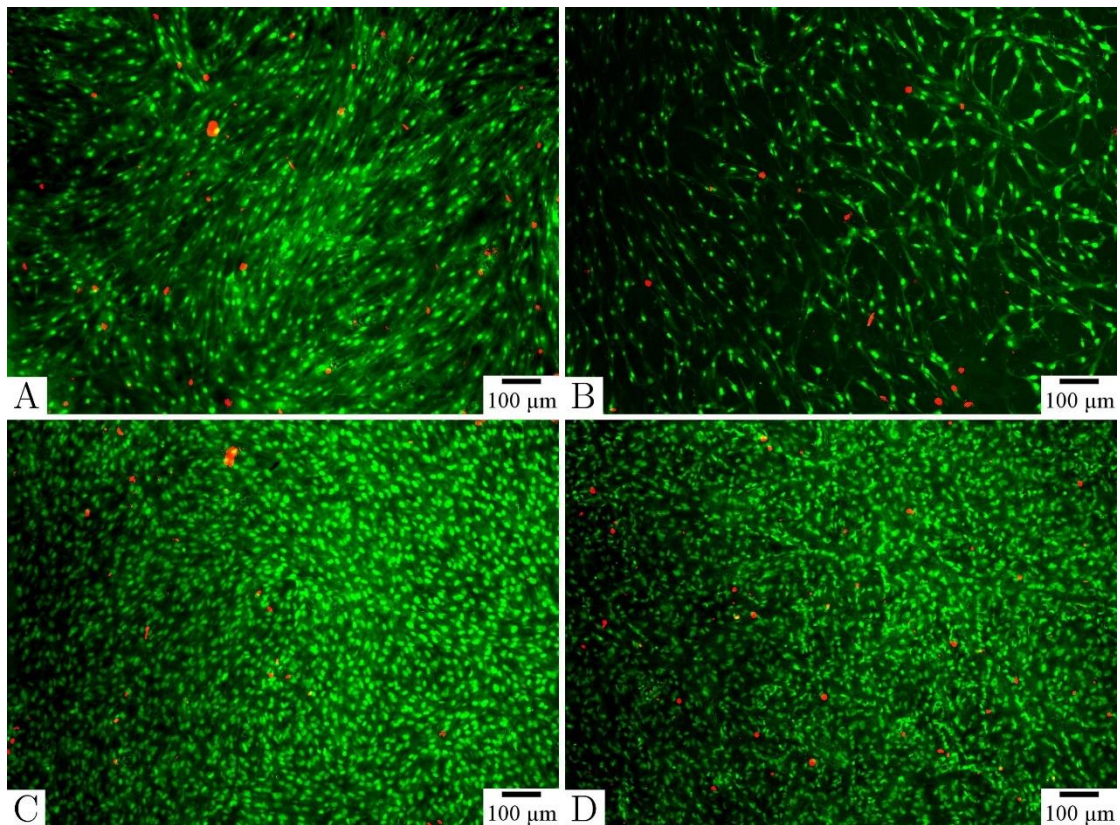


Abbildung 6.6: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach dem Zellbesiedelungsprozess.

(A) Die Innenseite des PU-Zylinders zeigt nach 24 Stunden FB-Besiedelung vermehrt grüne, vitale Zellen, welche gleichmäßig verteilt sind und morphologisch FB zugeordnet werden können. Vereinzelt und gleichmäßig verteilt sind rote, tote Zellen ( $n = 43$ ) zu sehen. (B) Die Außenseite des FB-besiedelten PU-Zylinders weicht deutlich von der Innenseite ab. Die FB sind hier zwar ebenfalls vital (tote Zellen:  $n = 17$ ), aber die Zellen als einzelne abzugrenzen. (C) Nach zusätzlicher EC-Besiedelung zeigt die Innenseite des PU-Scaffolds gleichmäßig verteilte, vitale EC. Tote Zellen sind stellenweise und gleichmäßig verteilt zu finden ( $n = 23$ ). (D) Die Außenseite der EC-besiedelten PU-Zylinder zeigt keine Unterschiede zur Innenseite. Die vermehrt vitalen Zellen sind gleichmäßig verteilt (tote Zellen:  $n = 36$ ). Bemerkung: Die linksseitige Verdunkelung ist ein Aufnahmeartefakt.

Nach der statischen Kultivierung (G1 und G3) ergeben sich auf der Innen- wie Außenseite keine Unterschiede in der Verteilung der Zellen. Es zeigt sich eine homogene Ausbildung der Zellschicht mit gleichmäßiger Verteilung der vitalen und wenigen toten Zellen. Vergleichend mit den Proben nach Besiedelung erscheint die Zellschicht bei den FB-besiedelten Scaffolds (G1) wesentlich dichter (*siehe Abb. 6.7; A*). Zu dokumentieren ist eine zahlenmäßige Vermehrung der FB, welche insgesamt strukturierter wirken. Eine mehrschichtige Zelldecke und die charakteristische wirbelförmige Anordnung der FB sind vorhanden. Tote Zellen sind kaum nachweisbar.

Die Proben der statischen Kultivierung von FB- und zusätzlich EC-besiedelten Scaffolds (G3) zeigen ebenfalls mehr vitale Zellen (*siehe Abb. 6.7; B*). Die vitalen EC können gut differenziert werden und nur vereinzelt sind tote Zellen nachzuweisen.

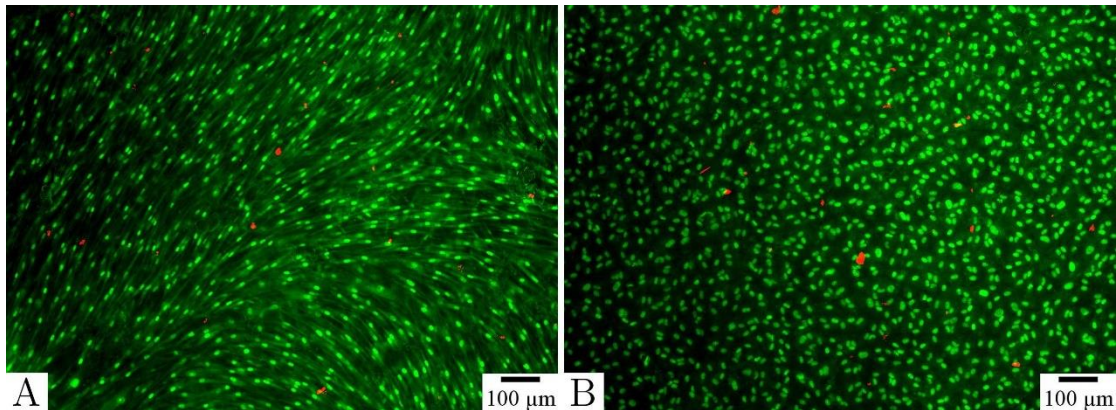


Abbildung 6.7: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach sieben Tagen statischer Kultivierung (G1 und G3).

(A) FB-besiedelte, statisch kultivierte Proben (G1) zeigen an der Innen- wie Außenseite fast ausschließlich vitale, spindelförmige FB, welche gleichmäßig verteilt sind. Einzelne, wenige tote Zellen sind sichtbar ( $n = 15$ ). (B) Nach sieben Tagen statischer Kultivierung der EC-besiedelten Proben (G3) sind an der äußeren wie inneren Seite des PU-Zylinders vitale, gleichmäßig verteilte Zellen zu dokumentieren. Morphologisch erscheinen die EC als runde Zellen. Tote Zellen lassen sich nur vereinzelt nachweisen ( $n = 13$ ). Bemerkung: Die linksseitige Verdunkelung ist ein Aufnahmeartefakt.

Nach dynamischer Konditionierung (G2 und G4) sind die Zellen ebenfalls nachweislich vital. Im Vergleich zum statischen Kultivierungsprozess lässt sich eine mäßige Zunahme der toten Zellen verzeichnen. Diese sind wiederum gleichmäßig über der Oberfläche verteilt. Zwischen Innen- und Außenseite kann besonders bei den FB-besiedelten Proben (G2) ein Unterschied in der Zellverteilung beobachtet werden. An der Außenseite zeigen sich vereinzelte FB (*siehe Abb. 6.8; B*), wohingegen an der Innenseite die Zellen gleichmäßig verteilt sind (*siehe Abb. 6.8; A*).



Zusätzlich EC-besiedelte Proben (G4) zeigen auf der Innenseite des PU-Zylinders eine moderate Zunahme der toten Zellen (*siehe Abb. 6.8; C*). An der Außenseite sind mehr vitale als tote Zellen zu verzeichnen, welche gleichmäßig verteilt sind (*siehe Abb. 6.8; D*).

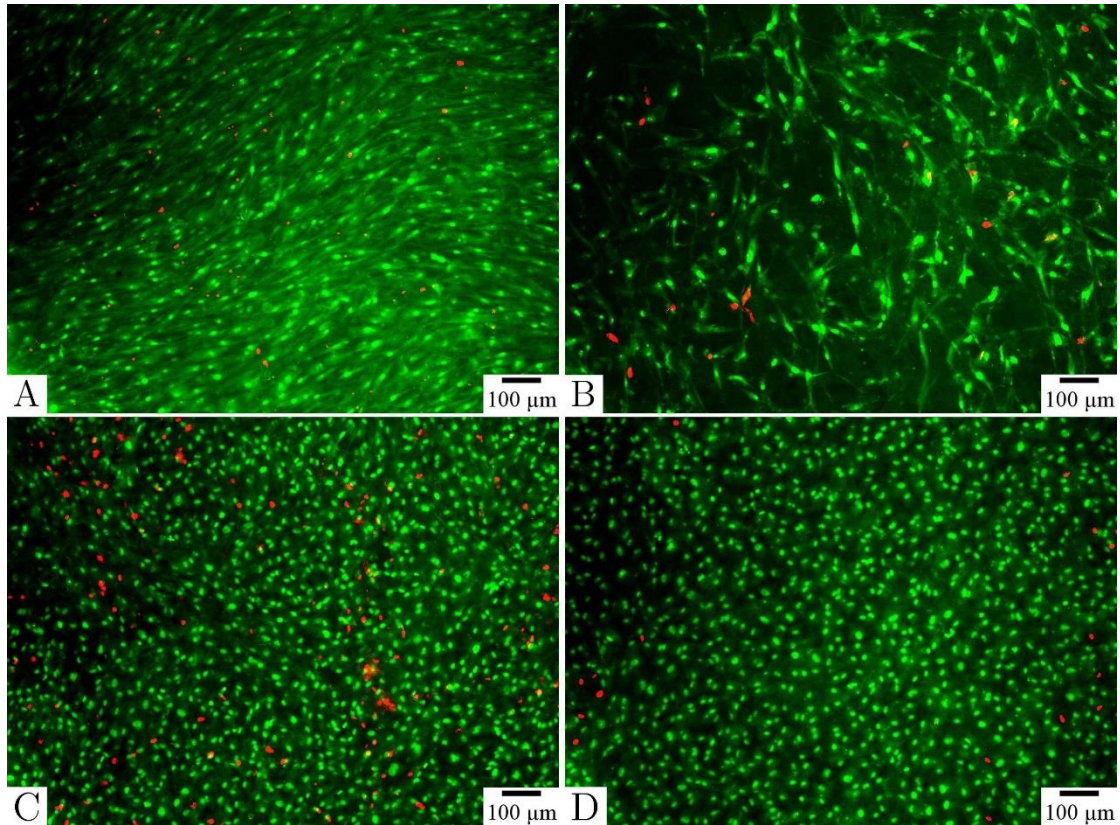


Abbildung 6.8: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach sieben Tagen dynamischer Konditionierung (G2 und G4).

(A) Innenseitig der FB-besiedelten, dynamisch konditionierten Proben (G2) sind überwiegend vitale, gleichmäßig verteilte Zellen präsent. Die Anzahl der toten Zellen hat im Vergleich zur statischen Kultivierung mäßig zugenommen ( $n = 59$ ). (B) Auf der Außenseite der FB-besiedelten, konditionierten Proben (G2) sind einzelne, hauptsächlich vitale Zellen an dem PU-Material haftend (tote Zellen:  $n = 19$ ). (C) Die innere Seite des PU-Zylinders mit zusätzlicher EC-Besiedelung (G4) zeigt überwiegend vitale Zellen. Im Vergleich zu statisch kultivierten Proben ist eine Zunahme an toten Zellen ( $n = 128$ ) zu sehen. (D) Die Außenseite der EC-besiedelten Proben (G4) zeigt regelrecht verteilte, vitale Zellen. Tote Zellen sind spärlich ( $n = 17$ ). Bemerkung: Die linksseitige Verdunkelung ist ein Aufnahmeartefakt.

Zellen	Besiedelung		Statische Kultivierung		Dynamische Konditionierung	
	FB	FB+EC	FB	FB+EC	FB	FB+EC
Vitale Zellen	+	+	+	+	+	+
Tote Zellen	-	-	-	-	-	+
Homogene Verteilung						
Innenseite	+	+	+	+	+	+
Außenseite	-	+	+	+	-	+

Tabelle 6.2: Überblick der LD-Färbungen.

(+) vorhanden, (-) nicht vorhanden.

### 6.3 Zellbesiedelungsnachweis mittels Immunfluoreszenz

Eine positive Anfärbung gegen TE-7 stellt sich rot dar, was die Präsenz von FB auf der Probenoberfläche beweist. Dies kann zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme beobachtet werden, so dass auf das Vorhandensein von FB in den Proben geschlossen werden kann (*siehe Abb. 6.9*). Bei zusätzlicher EC-Besiedelung zeigt sich in einigen Proben eine Zweisichtung mit positiver TE-7-Schicht unterhalb von Zellen (*siehe Abb. 6.9; B*). Dies spricht für die Anwesenheit von FB unter der EC-Zellschicht. Im Vergleich zu kultivierten und konditionierten Proben sind in den Proben nach den Besiedelungsprozessen (*siehe Abb. 6.9; A und B*) eine eher schwächere Expression von TE-7 und eine mäßige Zellschichtdicke nachzuweisen.

Eine vermehrte Farbtintensität und somit eine stärkere Expression von TE-7 kann explizit bei längerer Kultivierungsdauer unter statischen Bedingungen (G1 und G3, *siehe Abb. 6.9; C und E*) und nach dynamischer Konditionierung (G2 und G4, *siehe Abb. 6.9; D und F*) dokumentiert werden. Unter diesen Bedingungen ist auch die Migration einzelner FB in den inneren Bereich des PU-Materials zu beobachten, was an der Präsenz von Zellen sowie von TE-7 innerhalb des Materials zu sehen ist (*siehe Abb. 6.9; C, E und F, Pfeile*).

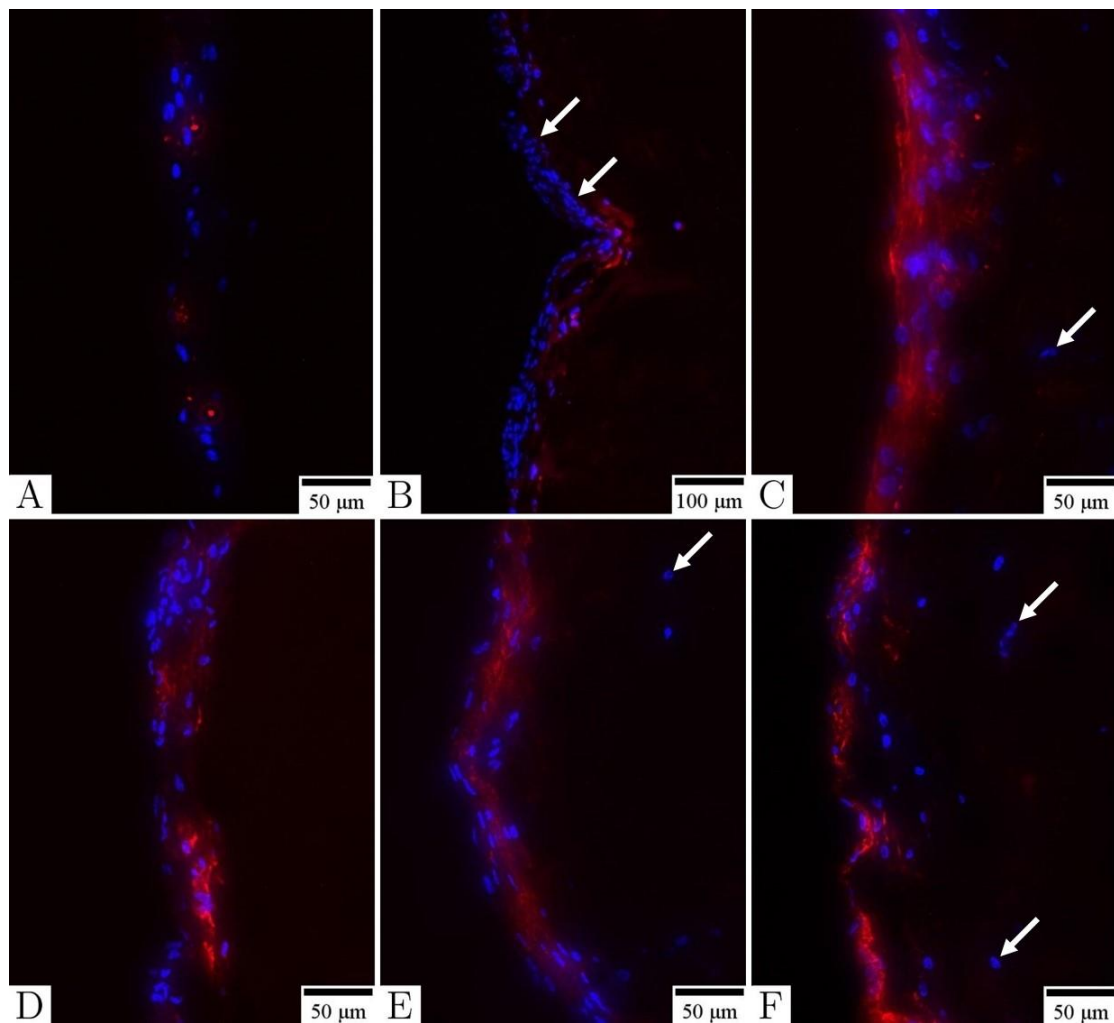


Abbildung 6.9: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen TE-7 (FB-spezifischer Marker, rot) und DAPI (DNA-Marker, blau).

Positive Anfärbungen gegen beide Komponenten sind in allen Proben vorhanden. Zur Orientierung wurde das PU-Material in den Aufnahmen stets auf der rechten Seite abgebildet. (A) Nach 24 Stunden FB-Besiedelung sind TE-7-positive FB auf der PU-Oberfläche vorhanden. (B) Nach zusätzlicher EC-Besiedelung ist eine TE-7-positive Schicht mit darüberliegenden Zellen nachweisbar. Dies deutet auf eine EC-Schicht (Bild B, Pfeile) oberhalb der FB hin. (C) Bei FB-besiedelten, statisch kultivierten Proben (G1) zeigt sich eine stärkere Expression sowie ein Einwachsen der Zellen in das PU-Material (Bild C, Pfeil). Die PU-Oberfläche ist von einem kontinuierlichen Band aus TE-7-positiven Zellen bedeckt. (D) FB-besiedelte, dynamisch konditionierte Proben (G2) weisen eine ebenfalls stärkere Expression von TE-7 als nach alleiniger Besiedelung auf. (E) FB- und EC-besiedelte, statisch kultivierte Proben (G3) ergeben eine breite, kontinuierliche TE-7-positive Schicht sowie ein Einwachsen der Zellen in das Material (Bild E, Pfeil). (F) Nach dynamischer Konditionierung der FB- und EC-besiedelten Proben (G4) ergibt sich eine starke TE-7-Expression, welche im Sinne eines kontinuierlichen, roten Bandes im Oberflächenbereich zu erkennen ist. Die Zellen migrieren deutlich in das PU-Material (Bild F, Pfeile).

---

Bei EC-besiedelten Proben konnte die Anfärbung gegen vWF-Antigene die Anwesenheit von EC bestätigen. Die vWF-Expression war auf allen EC-besiedelten Proben nachzuweisen und wird in den Abbildungen grün dargestellt (*siehe Abb. 6.10*). Es ergibt sich eine stärkere Expression nach statischer (G3, *siehe Abb. 6.10; C*) und dynamischer Konditionierung (G4, *siehe Abb. 6.10; D*) im Vergleich zu alleiniger Besiedelung (*siehe Abb. 6.10; A und B*). An einigen Stellen wird deutlich, dass bereits die FB-Besiedelung stattgefunden hat. Dabei erscheint ein positiv angefärbtes vWF-Band auf einer darunterliegenden Zellschicht (*siehe Abb. 6.10; A und B, Pfeile*). Nach statischer Kultivierung zeigt sich eine breitere, kontinuierlichere vWF-Schicht als nach Besiedelung (*siehe Abb. 6.10; C*). Nach dynamischer Konditionierung der FB- und EC-besiedelten Proben (G4) sind im Probeninneren Zellen zu identifizieren. In Korrelation mit den Anfärbungen auf TE-7 spricht dies für die Migration von FB in das Probeninnere (*siehe Abb. 6.10; D, Pfeile*).



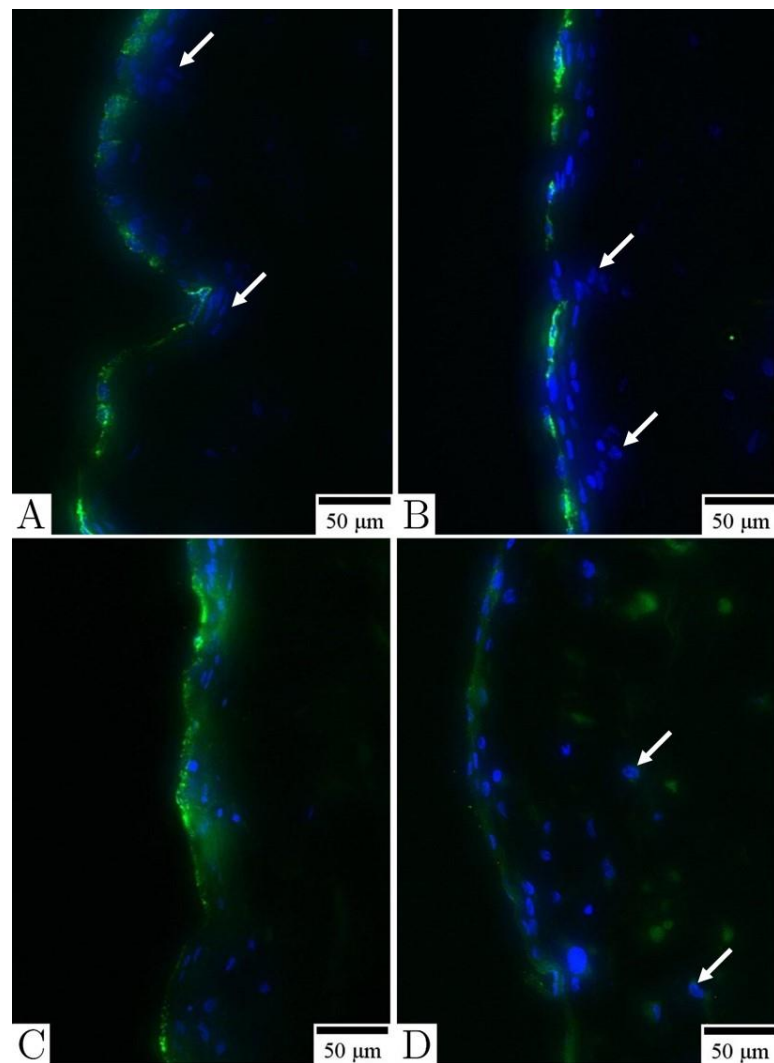


Abbildung 6.10: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen vWF (EC-spezifischer Marker, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).

Positive Anfärbungen gegen beide Komponenten sind in allen EC-besiedelten Proben vorhanden. Zur Orientierung wurde das PU-Material in den Aufnahmen stets auf der rechten Seite abgebildet. (A und B) Nach 24 Stunden EC-Besiedelung zeigt sich eine deutliche, hier grüne Farbreaktion gegen vWF. Besonders zu sehen ist eine vWF-positive Schicht aufgelagert auf Zellen. Diese Zellen können für eine unter der vWF-Schicht gelegene FB-Schicht (Bild A und B, Pfeile) sprechen. (C) Nach statischer Kultivierung der FB- und EC-besiedelten Proben zeigt sich eine kontinuierliche, breite vWF-positive Schicht. (D) Nach dynamischer Konditionierung der FB- und EC-besiedelten Proben stellt sich eine kontinuierliche vWF-Schicht dar. In diesen Proben sind Zellen im Probeninneren erkennbar. In Zusammenschau mit den TE-7-gefärbten Proben spricht dies für eine Migration von FB in das PU-Material (Bild D, Pfeile).

## 6.4 Nachweis extrazellulärer Matrixbestandteile mittels Immunfluoreszenz

Die Expression der EZM-Bestandteile Elastin und Fibronectin zeigt sich als grüne IF-Anfärbung. Beide EZM-Bestandteile wurden getrennt betrachtet. Die Färbung der zellkernständigen DNA erfolgte mittels DAPI. Da für alle Aufnahmen die gleiche Belichtungszeit verwendet wurde, korreliert die Intensität der Farbreaktion mit der Menge an nachgewiesenem EZM-Protein.

In allen Proben war eine Expression des EZM-Proteins Elastin nachzuweisen (*siehe Abb. 6.11*). Nach alleiniger FB-Besiedelung ist eine geringe Expression zu dokumentieren (*siehe Abb. 6.11; A*). Die Elastin-Schicht ist als schmales Band im Oberflächenbereich in Zellnähe zu sehen. Im Vergleich dazu bedingt die zusätzliche EC-Besiedelung mit anschließender dreitägiger Ruhephase eine sichtbar stärkere Elastinexpression (*siehe Abb. 6.11; B*). Auch hier zeigt sich Elastin als kontinuierliches Band, welches sich an der PU-Oberfläche um die Zellen herum gebildet hat.

Nach statischer Kultivierung des FB-besiedelten PU-Materials (G1) stellt sich die Elastinexpression entlang der Oberfläche als breites, kontinuierliches Farbband dar (*siehe Abb. 6.11; C*). Es lässt sich keine Ausbreitung in das PU-Material nachweisen, wobei die Elastinschicht dennoch breiter wirkt als nach alleiniger Besiedelung. Besonders um die Zellen herum ist eine starke Expression zu dokumentieren. Mit zusätzlicher EC-Besiedelung bei statischer Kultivierung (G3) kommt es zu einer starken Expression und deutlichen Intensitätszunahme der Anfärbung gegen Elastin (*siehe Abb. 6.11; E*). Das Farbband stellt sich hier eher feiner, aber äußerst intensiv dar und folgt den an der Oberfläche befindlichen Zellen.

Unter dynamischen Bedingungen ist bei alleiniger FB-Besiedelung (G2) ein äußerst geringer Unterschied zu statisch kultivierten Proben zu vermerken (*siehe Abb. 6.11; D*). Die Elastinexpression stellt sich als schwache Anfärbung besonders in Zellnähe dar. Hingegen zeigt sich bei zusätzlicher EC-Besiedelung der dynamisch konditionierten Proben (G4) eine massive Hochregulation der Elastinproduktion (*siehe Abb. 6.11; F*). Dies wird deutlich an einer intensiven Farbreaktion, die in Form einer kontinuierlichen Bande die Probenoberfläche vollständig bedeckt. Die Anfärbungen beschränken sich dabei hauptsächlich auf die Oberfläche, wobei an einigen Stellen zusätzlich eine Tendenz zum Übergang in die inneren PU-Anteile zu erkennen ist (*siehe Abb. 6.11; F, Pfeil*).

Insgesamt ergibt die zusätzliche EC-Besiedelung und anschließende dynamische Konditionierung (G4) eine Zunahme der Elastinproduktion. Über den Zeitverlauf betrachtet begünstigt eine längere

Ruhephase des Materials die Elastinexpression. Dies kann bei Vergleich der kultivierten bzw. konditionierten Proben mit Proben nach den Besiedelungsprozessen beobachtet werden.

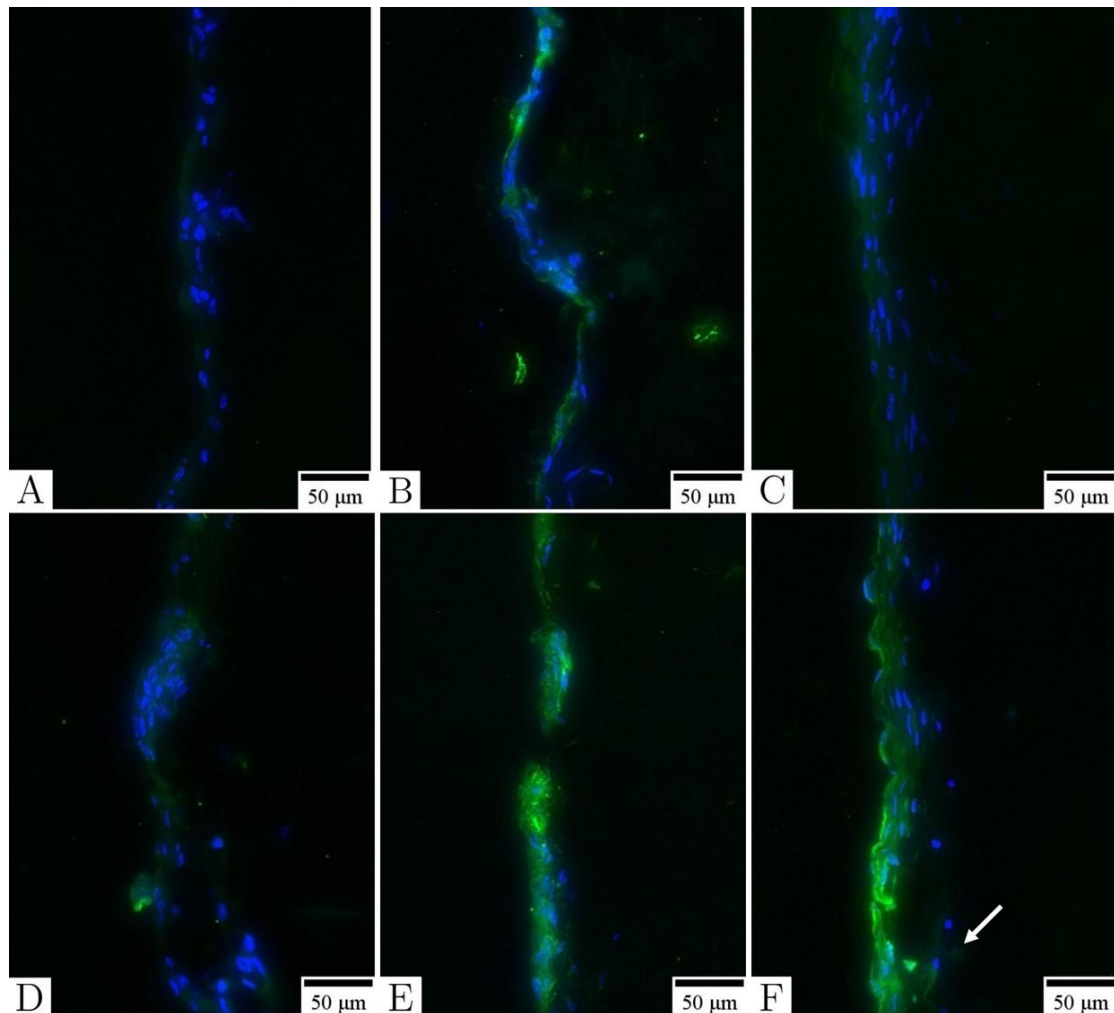


Abbildung 6.11: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen Elastin (Anti-Elastin, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).

Positive Anfärbungen gegen beide Komponenten sind in allen Proben vorhanden. Zur Orientierung wurde das PU-Material in den Aufnahmen stets auf der rechten Seite abgebildet. (A) Nach 24 Stunden FB-Besiedelung liegt eine schwache, auf die Oberfläche beschränkte Anfärbung gegen Elastin vor. (B) Zusätzliche EC-Besiedelung mit anschließender dreitägiger Ruhephase liefert eine kontinuierliche Elastinschicht, welche sich intensiver darstellt als nach alleiniger FB-Besiedelung. Diese Schicht ist in Zellenähe im Oberflächenbereich. (C) Bei FB-besiedelten, statisch kultivierten Proben (G1) zeigt sich eine schwach angefärbte, aber breite Elastinschicht im Oberflächenbereich. (D) Dynamisch konditionierte FB-Proben (G2) liefern ebenfalls eine eher schwach angefärbte Elastinschicht in Zellenähe im Oberflächenbereich. (E) Zusätzlich EC-besiedelte, statisch kultivierte Proben (G3) ergeben eine intensive Anfärbung gegen Elastin. Erkennbar ist eine kontinuierliche, kräftige Elastinschicht, welche sich auf den Oberflächenbereich beschränkt. (F) Die intensivste Elastinreaktion ist nach einer dynamischen Konditionierung der EC-besiedelten Proben (G4) zu sehen. Es ergibt sich eine kontinuierliche, breite Elastinschicht besonders im Oberflächenbereich in Zellenähe. Vereinzelt kann im Probeninneren Elastin identifiziert werden (Bild F, Pfeil).

Zellen	Besiedelung		Statische Kultivierung		Dynamische Konditionierung	
	FB	FB+EC	FB	FB+EC	FB	FB+EC
<b>Positiver Nachweis</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Intensität der Reaktion</b>	-	+	-	+	+	++
<b>Kontinuität der Elastinschicht</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Einwachsen in PU-Material</b>	-	-	-	-	-	+

Tabelle 6.3: Überblick der IF-Färbungen gegen Elastin.

(++) deutlich vorhanden, (+) vorhanden, (-) nicht vorhanden.

Die Expression von Fibronectin konnte in Proben aller Versuchsreihen durch eine grüne IF-Anfärbung nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.12).

Die alleinige FB-Besiedelung mit folgender statischer Kultivierung (G1) bewirkt eine dezente Fibronectinreaktion, welche sich als feine Linie auf die Oberfläche beschränkt (siehe Abb. 6.12; C). Eine zusätzliche EC-Besiedelung (G3) führt zu einem sichtbaren Unterschied in der Fibronectinexpression (siehe Abb. 6.12; E). Dies stellt sich als deutliche Verbreiterung der Fibronectinschicht im Sinne eines durchgängigen, breiten Saumes im Oberflächenbereich dar. Zudem kann Fibronectin im inneren Bereich des PU-Materials nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.12; E, Pfeile).

Hierzu lässt sich unter dynamischen Bedingungen (G2 und G4) im Vergleich eine beachtliche Intensitätszunahme der Anfärbung gegen Fibronectin dokumentieren (siehe Abb. 6.12; D und F). Bei zusätzlicher EC-Besiedelung (G4) ist eine besonders starke Fibronectinexpression präsent (siehe Abb. 6.12; F). Es finden sich ein ausgeprägter, grüner Fibronectinsaum an der Oberfläche und Fibronectin im Probeninneren (siehe Abb. 6.12; F, Pfeile). Bei alleiniger FB-Besiedelung unter dynamischen Bedingungen (G2) ist im Vergleich zu statischer Kultivierung (G1) ebenfalls eine Intensitätszunahme der Reaktion nachzuweisen (siehe Abb. 6.12; D). Jedoch ist die Farbinintensität mit den nach Besiedelungsprozess entnommenen Proben (siehe Abb. 6.12; A und B) vergleichbar.

Generell kann festgestellt werden, dass eine EC-Besiedelung und anschließende dynamische Konditionierung (G4) die Fibronectinexpression deutlich intensivieren. In EC-besiedelten Proben, welche direkt nach den Besiedelungsprozessen entnommen wurden, lässt sich ebenfalls eine stärkere Fibronectinexpression nachweisen als nach alleiniger FB-Besiedelung. Im Verlauf einer Versuchsreihe von der Besiedelung bis zum Abschluss konnte insgesamt eine deutliche Zunahme der Fibronectinexpression beobachtet werden.

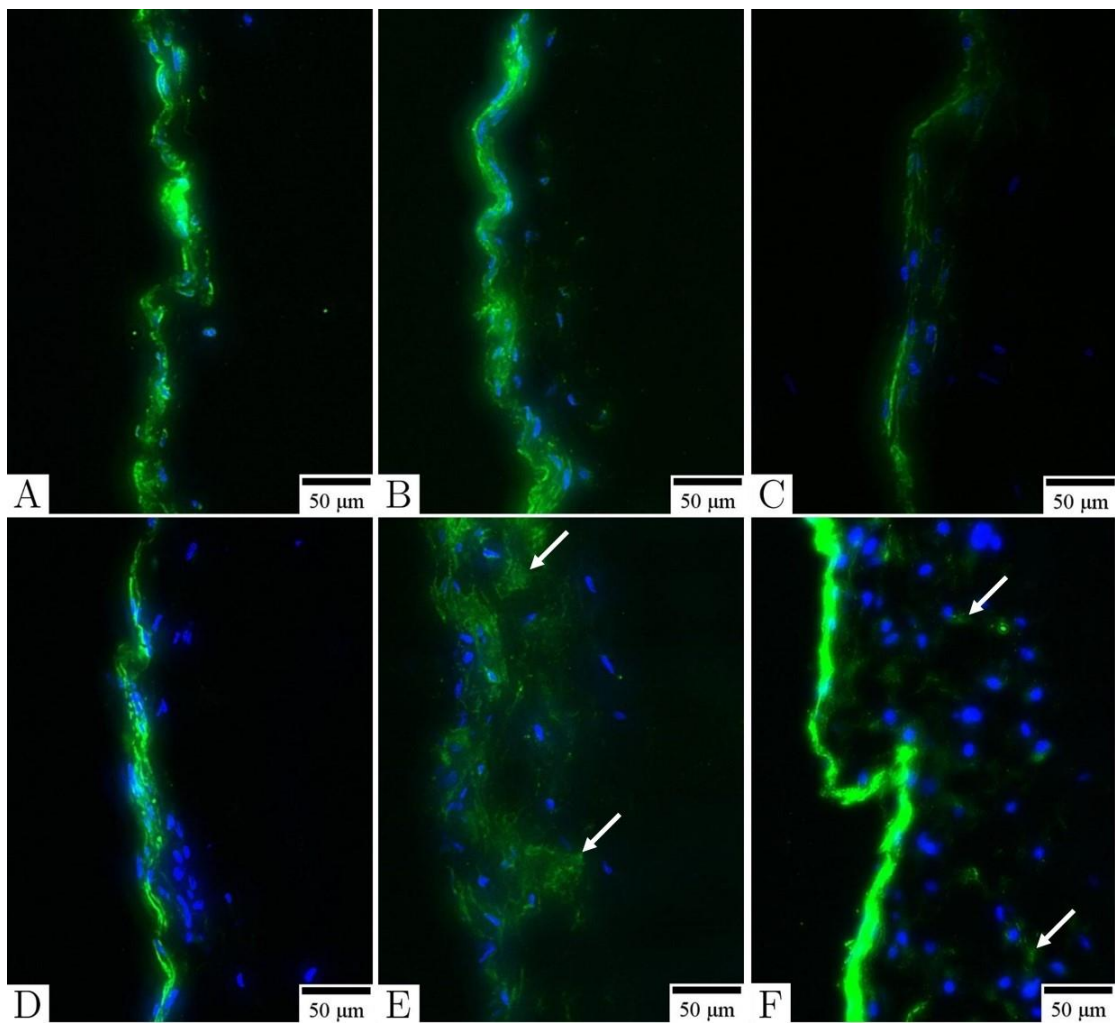


Abbildung 6.12: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen Fibronectin (Anti-Fibronectin, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).

Positive Anfärbungen gegen beide Komponenten sind in allen Proben vorhanden. Zur Orientierung wurde das PU-Material in den Aufnahmen stets auf der rechten Seite abgebildet. (A) Nach 24 Stunden FB-Besiedelung mit anschließend dreitägiger Ruhephase zeigt sich eine kontinuierliche Fibronectinschicht im Oberflächenbereich. (B) Im Vergleich dazu findet sich nach zusätzlicher EC-Besiedelung mit anschließend dreitägiger Ruhephase eine stärkere Expression von Fibronectin. Hier stellt sich die Schicht ebenfalls kontinuierlich dar. (C) Bei FB-besiedeltem, statisch kultiviertem PU-Material (G1) ist die Anfärbung gegen Fibronectin im Vergleich zu den Besiedelungsprozessen eher schwach. Dennoch zeigt sich auch hier eine kontinuierliche Schicht im Oberflächenbereich. (D) Die FB-besiedelten, dynamisch konditionierten Proben (G2) ergeben einen Fibronectinnachweis ähnlich dem nach den Besiedelungsprozessen. Die Fibronectinschicht erscheint als kontinuierliches Band im Oberflächenbereich. (E) Die zusätzlich EC-besiedelten, statisch kultivierten Proben (G3) ergeben einen Fibronectinnachweis, welcher den statisch kultivierten Proben nach alleiniger FB-Besiedelung gleicht. Bei zusätzlicher EC-Besiedelung lässt sich bei diesen Proben auf das Vorhandensein von Fibronectin im Inneren des PU-Materials schließen (Bild E, Pfeile). (F) Nach dynamischer Konditionierung der EC-Proben (G4) erscheint ein intensiv angefärbtes Fibronectinband im Oberflächenbereich um die Zellen herum. Zudem ist Fibronectin deutlich im Probeninnere nachzuweisen (Bild F, Pfeile).

	Besiedelung		Statische Kultivierung		Dynamische Konditionierung	
	FB	FB+EC	FB	FB+EC	FB	FB+EC
<b>Zellen</b>						
<b>Positiver Nachweis</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Intensität der Reaktion</b>	+	+	-	+	+	++
<b>Kontinuität der Fibronectinschicht</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Einwachsen in PU-Material</b>	-	-	-	+	-	++

Tabelle 6.4: Überblick der IF-Färbungen gegen Fibronectin.

(++) deutlich vorhanden, (+) vorhanden, (-) nicht vorhanden.

## 6.5 Histologische Färbung

Mittels der histologischen Pikrosiriusrot-Färbung erfolgte der Nachweis von Kollagenanteilen. Dabei stellen sich die Kollagen-reichen Anteile rot dar. Das Zytoplasma der Zellen färbt sich gelb an. In allen Proben können Kollagenanteile nachgewiesen werden.

Nach den Besiedelungsprozessen (*siehe Abb. 6.13; A und B*) stellt sich die Kollagenschicht generell als feine, kontinuierliche, rötliche Linie im Oberflächenbereich dar. Nach zusätzlicher EC-Besiedelung zeigt sich im Vergleich mit alleiniger FB-Besiedelung (*siehe Abb. 6.13; A*) eine leichte Zunahme der Schichtdicke (*siehe Abb. 6.13; B*).

Statische Kultivierung (G1) oder dynamische Konditionierung (G2) FB-besiedelter Proben liefert im Vergleich zu Proben nach Besiedelungsprozessen eine deutliche Zunahme in der Stärke der Kollagenschicht (*siehe Abb. 6.13; C und D*). Diese stellt sich als rötlich gefärbtes, breites Band im Oberflächenbereich dar. Nach statischer Kultivierung (G1) sind Kollagenanteile im Probeninneren nachzuweisen (*siehe Abb. 6.13; C, Pfeile*). Die dynamische Konditionierung (G2) ergibt eine ähnlich breite Kollagenschicht, welche nicht im PU-Material zu sehen ist (*siehe Abb. 6.13; D*).

Sowohl nach statischer Kultivierung (G3) als auch dynamischer Konditionierung (G4) führt eine zusätzliche EC-Besiedelung der Proben zu einer deutlichen Veränderung der Kollagenschicht (*siehe Abb. 6.13; E und F*). Es ist eine Farbintensitäts- sowie Schichtdickenzunahme zu verzeichnen. Statisch kultivierte EC-besiedelte Proben (G3) ergeben ein breites, farbintensives Kollagenband im Oberflächenbereich (*siehe Abb. 6.13; E*). Die Schicht zeigt sich stellenweise aufgelockert, aber ist im Vergleich zu Proben nach Besiedelungsprozessen kräftiger. Die dynamische Konditionierung (G4) führt zu einer ausgeprägten Expression der Kollagenanteile, sodass sich eine deutlich rote Schicht erkennen lässt (*siehe Abb. 6.13; F*). Die Kollagenschicht stellt sich als dichtes, breites,

---

kontinuierliches Band im Oberflächenbereich dar. In vereinzelt Proben sind Kollagenanteile im PU-Material zu verzeichnen (*siehe Abb. 6.13; F, Pfeil*).

Die Differenzierung zwischen Kollagenfasern des Typs I und III kann unter polarisiertem Licht erfolgen: Diese Fasern weisen eine rotgelbe (Typ I) bzw. grüne (Typ III) Doppelbrechung auf. Die derartige Begutachtung der Proben dieser Arbeit lieferte jedoch keine Unterscheidung der Fasern. Begründet liegt dies vermutlich darin, dass nur zu gerichteten Fasern zusammengelagertes Kollagen unter dem Polarisationsmikroskop zur Darstellung kommt. Hingegen können einzelne, nicht zu Fasern zusammengelagerte, ungerichtete Kollagenbestandteile wie in den vorhandenen Proben nur in der Lichtmikroskopie begutachtet werden.



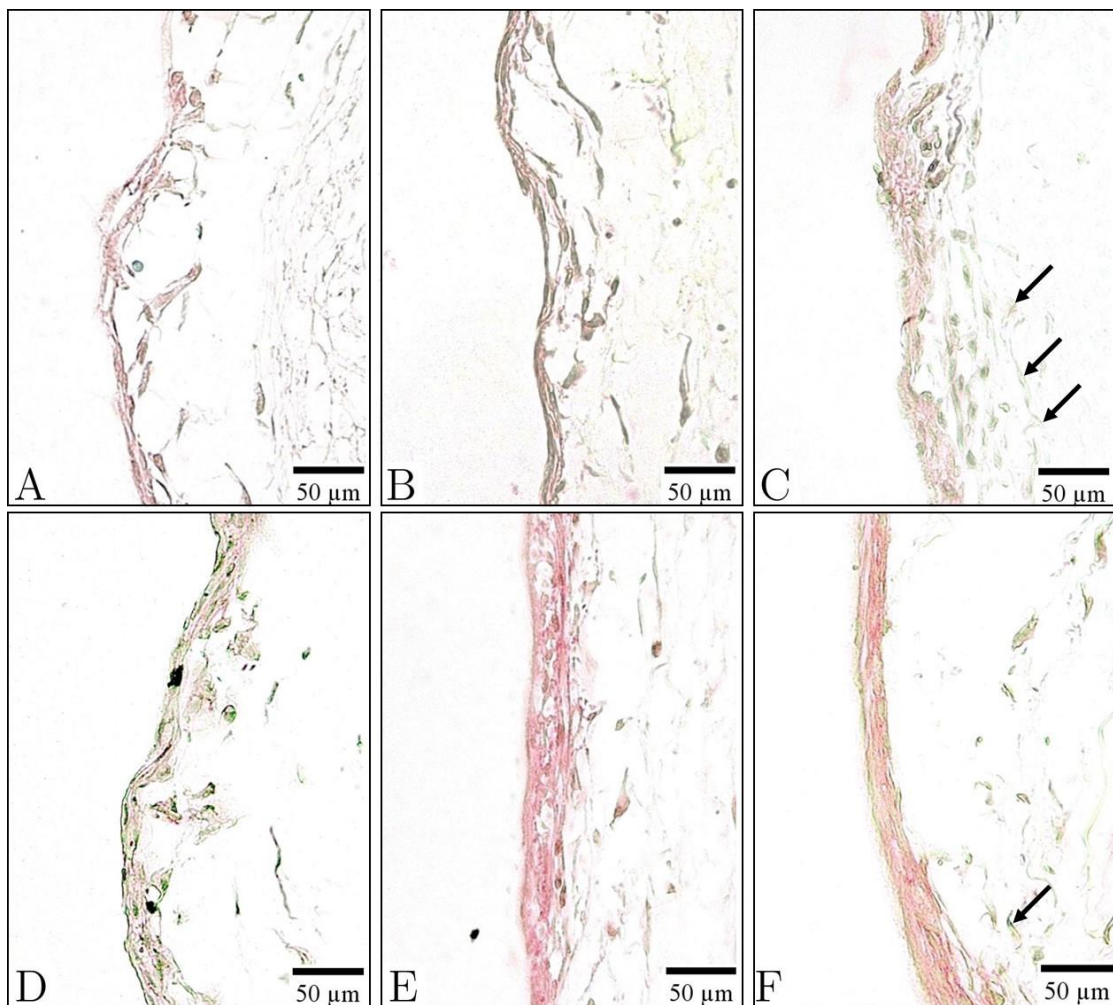


Abbildung 6.13: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen nach histologischer Pikrosiriusrot-Färbung.

Positive Anfärbungen gegen Kollagenanteile sind in allen Proben vorhanden (Kollagenanteile rot, Zytoplasma gelb). Rechtsseitig im Bild ist das PU-Material abgebildet. (A) Die FB-besiedelten Proben zeigen nach Besiedelung eine dünne, kontinuierliche, rötliche Kollagenschicht im Oberflächenbereich. (B) Nach zusätzlicher EC-Besiedelung erscheint die Kollagenschicht etwas breiter als nach alleiniger FB-Besiedelung. (C) FB-besiedelte, statisch kultivierte PU-Proben (G1) liefern eine deutliche Zunahme der Schichtdicke im Vergleich zu alleiniger Besiedelung. Kollagenanteile im Probeninneren können dokumentiert werden (Bild C, Pfeile). (D) Dynamische Konditionierung des FB-besiedelten Materials (G2) führt ebenfalls zu einer Zunahme der Schichtdicke. An manchen Stellen ist ein produktionsbedingtes Ablösen der Zellschicht von der PU-Oberfläche zu sehen (Bild D). Im Probeninneren können keine Kollagenanteile beobachtet werden. (E) Nach statischer Kultivierung der EC-besiedelten Proben präsentiert sich eine intensivrote, breite Kollagenschicht im Oberflächenbereich. Die Schicht ist teilweise aufgelockert, aber kontinuierlich und kräftiger als nach alleiniger Besiedelung. (F) EC-besiedelte, dynamisch konditionierte Proben zeigen eine intensiv rot gefärbte, kräftige Kollagenschicht. Diese stellt sich als kontinuierliches, kompaktes Band an der Oberfläche dar. Vereinzelt sind Kollagenanteile im Probeninneren präsent (Bild F, Pfeil).



Zellen	Besiedelung		Statische Kultivierung		Dynamische Konditionierung	
	FB	FB+EC	FB	FB+EC	FB	FB+EC
Positiver Nachweis	+	+	+	+	+	+
Intensität der Reaktion	-	+	-	+	+	++
Kontinuität der Kollagenschicht	+	+	+	+	+	+
Einwachsen in PU-Material	-	-	-	+	-	++

Tabelle 6.5: Überblick der histologischen Färbung.

(++) deutlich vorhanden, (+) vorhanden, (-) nicht vorhanden.

## 6.6 rt-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression von  $\alpha 1$ -Kollagen Typ I,  $\alpha 1$ -Kollagen Typ IV, Elastin, Fibronectin1,  $\alpha 1$ -Laminin, Hyaluron-Synthase2, Interleukin-1a und Interleukin-8 erfolgte, indem die Zielwerte der einzelnen Gruppen in Referenz zu den Housekeeping-Genen gesetzt wurden. Die daraus errechneten Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurden mithilfe des ungepaarten t-Tests statistisch ausgewertet. Um Auswirkungen der Flusskonditionierung (*siehe Abb. 6.14 und Abb. 6.15*) und der EC-Besiedelung (*siehe Abb. 6.16*) zu beurteilen, wurden Mittelwerte zweier Gruppen ins Verhältnis zueinander gesetzt und verglichen. Die Verhältniswerte wurden gemittelt und mit Standardabweichung in den Abbildungen (*siehe Abb. 6.14 bis 6.16*) graphisch dargestellt. Zahlenwerte größer als 1 zeigen eine Hochregulation der Genexpression an, Werte zwischen 0 und 1 beschreiben eine Abnahme der Genexpression und ein Wert gleich 1 bedeutet keine Änderung in der Genexpression im Vergleich der beiden Gruppen zueinander.

Insgesamt muss angemerkt werden, dass aufgrund der teilweise hohen Streuung der Zahlenwerte die quantitativen Ergebnisse der rt-PCR nur bedingt interpretiert werden können.

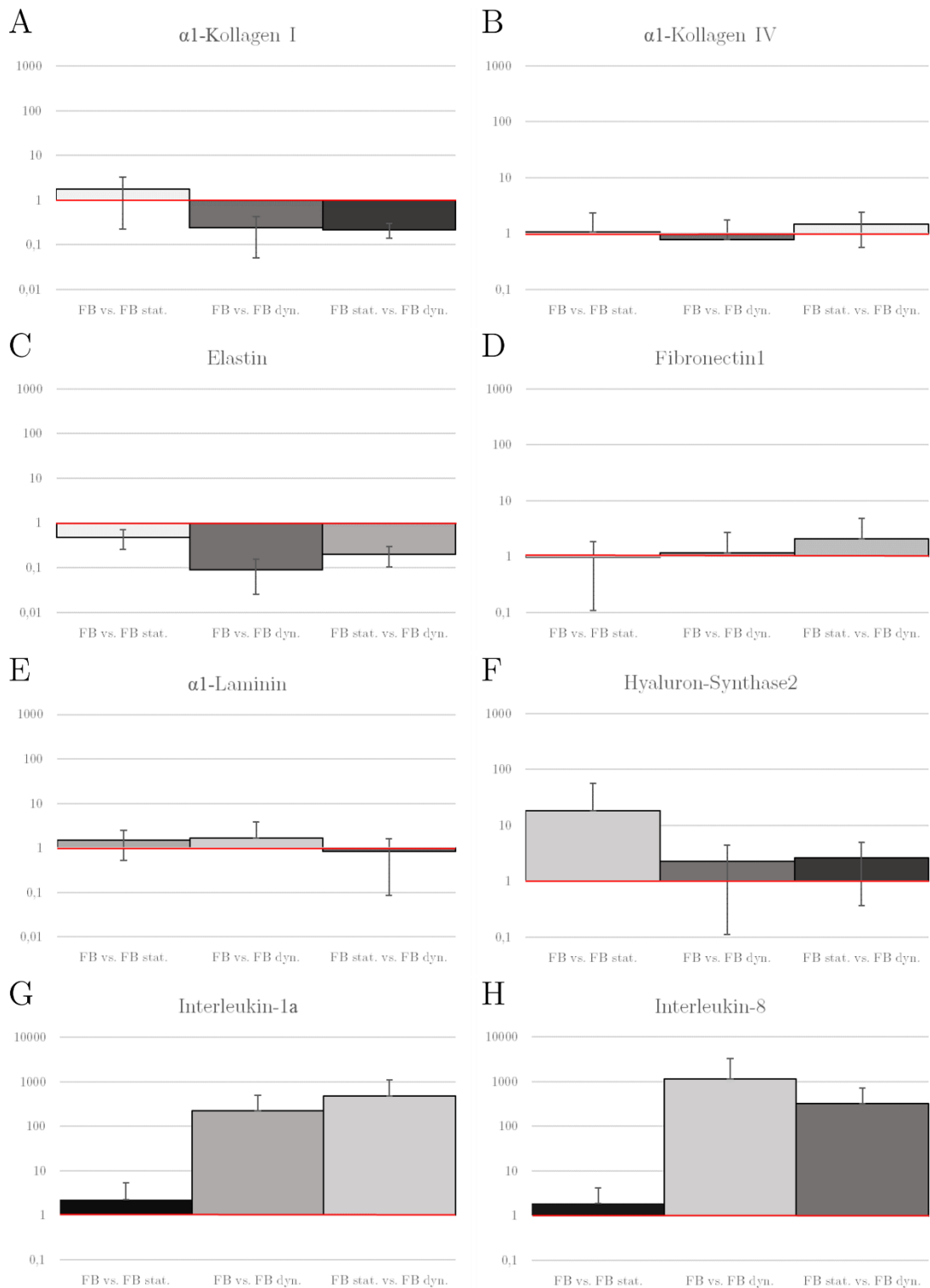


Abbildung 6.14: rt-PCR zur Auswirkung der Flusskonditionierung auf die Genexpression bei FB-besiedelten Proben.

Die Werte werden zur besseren Vergleichbarkeit in einer logarithmischen Skala dargestellt. Für jeden EZM-Bestandteil wurde ein Balkendiagramm erstellt. Die y-Achse stellt die Höhe der Genexpression in relativen, gemittelten Zahlenwerten mit Standardabweichung dar. Zahlenwerte größer als 1 zeigen eine Hochregulation der Genexpression an, Werte zwischen 0 und 1 beschreiben

eine Abnahme der Genexpression und ein Wert gleich 1 bedeutet keine Änderung in der Genexpression im Vergleich der beiden Gruppen zueinander. An der x-Achse sind die zwei Gruppen angegeben, welche miteinander verglichen wurden. Der erste Balken zeigt den Vergleich einer 24 h FB-Besiedelung + 3 d statische Kultivierung (FB) zu 10 d statischer Kultivierung nach FB-Besiedelung (G1, FB stat.). Der zweite Balken zeigt den Vergleich einer 24 h FB-Besiedelung + 3 d statische Kultivierung (FB) zu 10 d dynamischer Konditionierung nach FB-Besiedelung (G2, FB dyn.). Der dritte Balken stellt den Vergleich von FB stat. (G1) zu FB dyn. (G2) dar.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der rt-PCR eine Tendenz in der Genexpression der EZM-Bestandteile. Es ergibt sich, dass die alleinige FB-Besiedelung generell zu einer Abnahme der EZM-Bestandteile führt (siehe Abb. 6.14). Von signifikanter Bedeutung ist die Abnahme der Expression von  $\alpha$ 1-Kollagen Typ I bei alleinig FB-besiedelten Proben nach dynamischer Konditionierung (G2) im Vergleich zu Proben nach Besiedelungsprozessen ( $p = 0,02$ ) und nach statischer Kultivierung (G1,  $p = 0,02$ ) (siehe Abb. 6.14; Diagramm A). Die dynamische Konditionierung der FB-besiedelten Proben (G2) resultiert in einer signifikanten Zunahme der Entzündungsparameter Interleukin-1a ( $p = 0,03$ ) und -8 ( $p = 0,04$ ) im Vergleich zu Proben nach alleiniger Besiedelung und nach statischer Kultivierung (G2; siehe Abb. 6.14; Diagramme G und H).

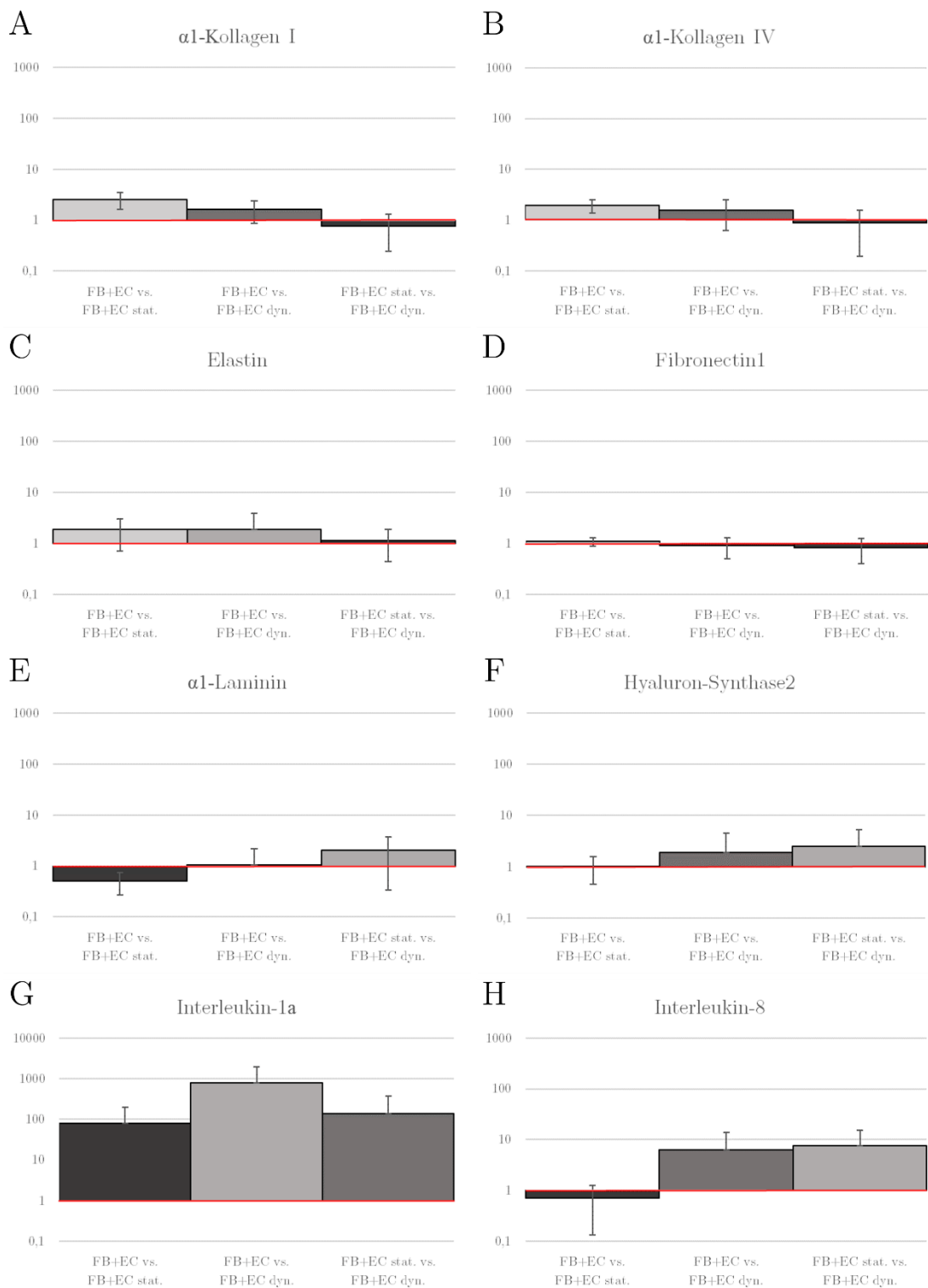


Abbildung 6.15: rt-PCR zur Auswirkung der Flusskonditionierung auf die Genexpression bei FB- und zusätzlich EC-besiedelten Proben.

Die Werte werden zur besseren Vergleichbarkeit in einer logarithmischen Skala dargestellt. Für jeden EZM-Bestandteil wurde ein Balkendiagramm erstellt. Die y-Achse stellt die Höhe der Genexpression in relativen, gemittelten Zahlenwerten mit Standardabweichung dar. Zahlenwerte größer als 1 zeigen eine Hochregulation der Genexpression an, Werte zwischen 0 und 1 beschreiben

eine Abnahme der Genexpression und ein Wert gleich 1 bedeutet keine Änderung in der Genexpression im Vergleich der beiden Gruppen zueinander. An der x-Achse sind die zwei Gruppen angegeben, welche miteinander verglichen wurden. Der erste Balken zeigt den Vergleich einer 24 h EC-Besiedelung + 3 d statische Kultivierung (FB+EC) zu 10 d statischer Kultivierung nach FB- und EC-Besiedelung (G3, FB+EC stat.). Der zweite Balken zeigt den Vergleich einer 24 h EC-Besiedelung + 3 d statische Kultivierung (FB+EC) zu 10 d dynamischer Konditionierung nach FB- und EC-Besiedelung (G4, FB+EC dyn.). Der dritte Balken stellt den Vergleich von FB+EC stat. (G3) zu FB+EC dyn. (G4) dar.

Eine alleinige statische Kultivierung der FB- und EC-besiedelten Proben (G3) ergibt eine signifikante Abnahme von  $\alpha$ 1-Laminin ( $p = 0,002$ ) im Vergleich zu Proben nach den Besiedelungsprozessen (siehe Abb. 6.15; Diagramm E). Werden die FB- und EC-besiedelten statisch kultivierten (G3) mit den dynamisch konditionierten Proben (G4) verglichen, ergibt sich ein hochreguliertes Interleukin-8 ( $p = 0,03$ ) nach dynamischer Konditionierung (siehe Abb. 6.15; Diagramm H).

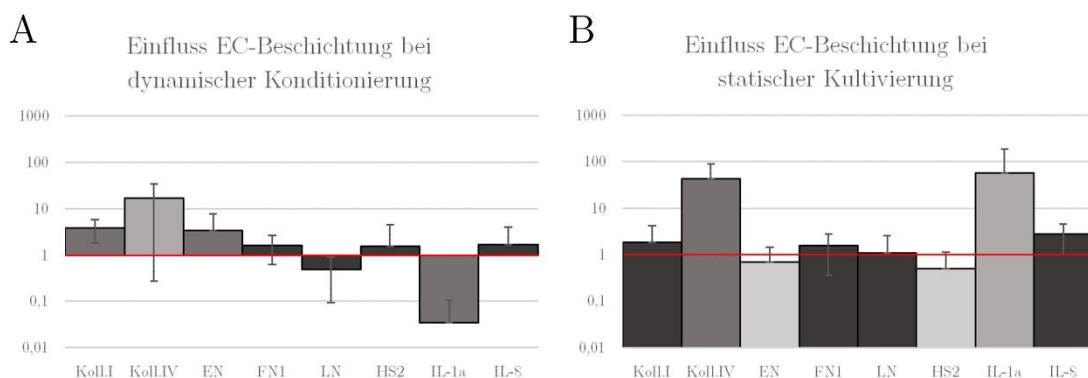


Abbildung 6.16: rt-PCR zur Auswirkung der EC-Beschichtung auf die Genexpression.

Die Werte werden zur besseren Vergleichbarkeit in einer logarithmischen Skala darstellt. Das Balkendiagramm A stellt den Vergleich von statischer Kultivierung ohne (G1) und mit (G3) EC-Beschichtung dar. Das Balkendiagramm B zeigt den Vergleich der Proben nach dynamischer Konditionierung ohne (G2) und mit (G4) EC-Beschichtung. Die y-Achse stellt die Höhe der Genexpression in relativen, gemittelten Zahlenwerten mit Standardabweichung dar. Zahlenwerte größer als 1 zeigen eine Hochregulation der Genexpression an, Werte zwischen 0 und 1 beschreiben eine Abnahme der Genexpression und ein Wert gleich 1 bedeutet keine Änderung in der Genexpression im Vergleich der beiden Gruppen zueinander. An der x-Achse sind die EZM-Bestandteile angegeben: Koll. I ( $\alpha$ 1-Kollagen Typ I), Koll. IV ( $\alpha$ 1-Kollagen Typ IV), EN (Elastin), FN1 (Fibronectin1), LN ( $\alpha$ 1-Laminin), HS2 (Hyaluron-Synthase2), IL-1a (Interleukin-1a) und IL-8 (Interleukin-8).

Betrachtet man die statisch kultivierten Proben ohne (G1) und mit EC-Besiedelung (G3) zeigt sich einerseits ein signifikant hochreguliertes  $\alpha$ 1-Kollagen Typ IV ( $p = 0,02$ ) andererseits eine

herunterregulierte Hyaluron-Synthase2 ( $p = 0,04$ ) bei EC-besiedelten, statisch kultivierten Proben (G3). Eine signifikante Reduktion von Interleukin-8 ( $p = 0,03$ ) ergibt sich bei Vorhandensein einer EC-Schicht bei statisch kultivierten Proben (G3). Werden die dynamisch konditionierten Proben ohne (G2) und mit EC-Besiedelung (G4) verglichen, ergeben sich bei einer EC-Schicht deutliche Unterschiede in der Expression:  $\alpha 1$ -Kollagen I zeigt eine signifikante Hochregulation ( $p = 0,02$ ) bei FB- und EC-besiedelten Proben (G4) an (*siehe Abb. 6.16*). Zusätzlich ist bei EC-besiedelten Proben (G4) eine signifikante Reduktion des Entzündungsparameters Interleukin-1a ( $p = 0,03$ ) nach dynamischer Konditionierung zu verzeichnen.

## 6.7 pH-Wert-Messungen

Jeweils im Anschluss an die statische Kultivierung und dynamische Konditionierung wurde der pH-Wert des Zellmediums gemessen, um eine eventuelle Veränderung des Zellverhaltens durch azidotische oder alkalische Bedingungen zu erkennen. Als Richtwerte wurden die pH-Werte von unbehandeltem FB- und EC-Medium vor der Verwendung gemessen. Der pH-Richtwert für das FB-Medium betrug konstant 7,33, jener von EC-Medium 7,92 (*siehe Tabelle 6.6*). Nach alleiniger FB-Besiedelung sind die pH-Werte generell leicht azidotisch (G1:  $7,18 \pm 0,02$ ; G2:  $7,26 \pm 0,05$ ) im Vergleich zu unbehandeltem FB-Medium. Nach statischer Kultivierung (G1) ist ein verstärkter Abfall des pH-Wertes als nach dynamischer Konditionierung (G2) zu verzeichnen. Nach zusätzlicher EC-Besiedelung sind die pH-Werte deutlich stärker gesunken (G3:  $7,19 \pm 0,09$ ; G4:  $7,30 \pm 0,16$ ) als nach alleiniger FB-Besiedelung. Auch zeigt sich besonders nach der statischen Kultivierung (G3) ein saureres Milieu als nach dynamischer Konditionierung (G4).

	pH-Wert
FB-Medium	7,33
EC-Medium	7,92
<b>Nach alleiniger FB-Besiedelung (FB-Medium)</b>	
10d statisch (G1)	$7,18 \pm 0,02$
10d dynamisch (G2)	$7,26 \pm 0,05$
<b>Nach zusätzlicher EC-Besiedelung (EC-Medium)</b>	
10d statisch (G3)	$7,19 \pm 0,09$
10d dynamisch (G4)	$7,30 \pm 0,16$

Tabelle 6.6: pH-Wert-Messungen.

Die Messungen erfolgten nach statischer Kultivierung und dynamischer Konditionierung der jeweils FB- oder zusätzlich EC-besiedelten Proben. Angegeben sind zusätzlich die Richtwerte des FB- und EC-Mediums.

## 7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung einer EZM auf zellbesiedelten, nicht-abbaubaren PU-Scaffolds untersucht. Die Auswirkungen von Flusskonditionierung sowie einer Besiedelung mit EC auf die EZM-Ausprägung wurden dabei analysiert. Im Vergleich zu statischer Kultivierung der PU-Scaffolds führten dynamische Flussbedingungen im Bioreaktor zu einer deutlichen Steigerung der EZM-Bestandteile. Auch längere Kultivierungs- bzw. Konditionierungszeiten sowie die zusätzliche EC-Besiedelung bewirkten eine stärkere Ausprägung der EZM. FB-besiedelte Scaffolds, welche im Bioreaktor flusskonditioniert wurden, zeigten abgelöste FB. Nach zusätzlicher EC-Besiedelung konnte dieses Ablösen von Zellen nicht beobachtet werden.

Für die Besiedelung der PU-Scaffolds wurden autologe, ausdifferenzierte FB und EC aus der Vena saphena magna isoliert. Derartige Zellen eigneten sich bereits in anderen Studien als ideale Zellquelle zur Herstellung von tissue-engineerten, kardiovaskulären Produkten [152, 153]. Übereinstimmend zu diesen Studien zeigten die FB und EC in dieser Arbeit hervorragende Kultivierungseigenschaften: Neben der einfachen Zellgewinnung konnte im immunzytologischen Nachweis die Reinheit der isolierten Zellen bestätigt werden. Die rasche Zellproliferation sowie die Möglichkeit der Kryopräservierung machten die Verwendung dieser Zellen besonders praktikabel.

Als Trägermaterial dienten in diesem Versuchsaufbau synthetische, nicht-abbaubare PU-Scaffolds. Das PU wurde zunächst auf seine Beständigkeit gegenüber der Formaldehyd-Gassterilisation getestet. Nach Sterilisation war keine Veränderung der PU-Faserstruktur in den REM-Aufnahmen zu sehen, sodass ein negativer Einfluss der Sterilisation auf das Material ausgeschlossen werden konnte. Dies bestätigend konnten *Mariscal et al.* nach Sterilisation keine Rückstände von Formaldehyd auf der PU-Oberfläche nachweisen [154]. Während der gesamten Versuchsreihe blieben die PU-Scaffolds formstabil, was die Eignung dieses haltbaren Materials zur Herstellung von tissue-engineerten Produkten weiter bestätigt. Demgegenüber berichteten einige Autoren wie *Wheatley et al.* über die Degeneration von nicht-abbaubarem PU [155]. Diese Degeneration aufgrund von angelagertem, thrombotischem Material könnte durch die Endothelialisierung des PU-Materials vermieden werden [156]. Dies wurde nicht nur in unserer Versuchsreihe durch die Zellbesiedelung gezeigt, sondern auch vielfach in der Literatur beschrieben: Besonders die konfluente EC-Schicht dient der Prävention der Thrombusbildung [28, 153, 157, 158] sowie der Vermeidung der möglichen PU-Degeneration [156]. Weiterhin bewies sich das PU in der vorliegenden Arbeit

als biokompatibles Material. Die Zellen zeigten nach Besiedelung eine gute Adhäsion an das PU, was in den REM-Aufnahmen durch die konfluente Zellschicht bewiesen wurde. Über den gesamten Versuchsverlauf waren deutlich mehr vitale als tote Zellen vorhanden und auch die Zellproliferation wurde nicht durch eine zelltoxische Reaktion aufgrund des PU beeinträchtigt. In Korrelation zu diesen Beobachtungen bestätigte die Studie von *He et al.* die *in-vitro* Biokompatibilität von PU bei einem kleinlumigen Gefäßersatz [159]. Die Arbeitsgruppe konnte mittels Zytotoxizitätstest zeigen, dass die PU-Gefäßprothese zellkompatibel war und damit die EC-Adhäsion nicht beeinträchtigte. Die Mikrostruktur und -architektur des PUs kann durch verschiedene Herstellungstechniken variiert und bestimmt werden [160]. Das in dieser Arbeit angewandte Elektrosponning-Verfahren ergab die poröse, faserige PU-Oberfläche, welche morphologische Ähnlichkeit zu nativem Kollagen aufweist. Die Porosität und Porengröße des PU sowie die Feinheit und Ausrichtung der PU-Fasern ermöglichten eine exzellente Zelladhäsion. Dies wurde durch die konfluente Zellschicht in den REM-Aufnahmen sowie durch den IF-Nachweis von TE-7 und vWF nach den Besiedelungsprozessen bestätigt. In Korrelation dazu zeigten auch andere Arbeitsgruppen, dass die genannten Eigenschaften des PU-Materials essentiell für Zelladhäsion und -migration sind [161, 162]. *Bergmeister et al.* konnten die Eignung einer PU-Gefäßprothese, welche mittels Elektrosponning hergestellt wurde, im Tiermodell untersuchen [163]. Bestätigend zu unseren *in-vitro* Beobachtungen zeigten diese Gefäßprothesen *in-vivo* exzellente Zelladhäsion, -migration und -proliferation sowie eine gute Biokompatibilität. Dennoch gab es in unserer Versuchsreihe einzelne FB-besiedelte PU-Scaffolds, an deren Außenseite nach dreitägiger Ruhephase keine konfluente Zellschicht nachzuweisen war. Dies lag vermutlich an einer veränderten PU-Oberfläche der Scaffold-Außenseite, was die geringere Zelladhäsion bedingt haben könnte.

Der in dieser Arbeit verwendete Besiedelungsbioreaktor ermöglichte die effektive Zellbesiedelung der PU-Scaffolds unter dynamischen Bedingungen. Die Zellauszählungen nach der 24-stündigen Besiedelungsperiode ergaben, dass 93% der FB bzw. 86% der EC an das PU angelagert waren. In Zusammenschau der LD- und REM-Aufnahmen zeigte sich nach der Besiedelung eine vitale, konfluente Zellschicht. Die spezifischen Marker gegen TE-7 und vWF lieferten den Beweis, dass das PU mit FB und EC besiedelt wurde. Die nur vereinzelt beobachtete freiliegende PU-Struktur an der Außenseite der FB-besiedelten Scaffolds könnte neben der oben genannten veränderten PU-Faserstruktur auch durch eine geringere Zelldistribution im Besiedelungsbioreaktor erklärbar sein. Trotz dessen wurden in der Literatur mehrfach die Vorteile der dynamischen gegenüber der sta-



tischen Zellbesiedelungstechnik beschrieben [68, 164]: Genannte Publikationen berichteten übereinstimmend, dass auf dynamisch besiedelten Trägermaterialien gleichmäßig hohe Zelldichten und deutlich mehr vitale Zellen nachzuweisen waren. Nach einer dynamischen Besiedelung konnte eine erhöhte EZM-Bildung beobachtet werden [165]. Auch in unseren Versuchen und dieser Arbeitsgruppe wurde die Effektivität dieser Besiedelungstechnik bewiesen [166].

Nach den Besiedelungsprozessen erfolgte unter anderem die Konditionierung von PU-Scaffolds unter dynamischen Bedingungen im Bioreaktor. Zum Vergleich der dynamisch konditionierten Proben dienten statisch kultivierte Kontrollgruppen. Der Konditionierungsbioreaktor konnte bereits in vorigen Versuchen dieser Arbeitsgruppe erfolgreich angewandt werden [150]. Der Bioreaktor erzeugte einen pulsatilen Fluss von bis zu 2.100 ml/min, welcher ungefähr dem physiologischen Fluss im Lungenkreislauf junger Schafe entspricht [167]. Die Flussrate wurde langsam von 690 ml/min auf 2.100 ml/min erhöht, wodurch die Anpassung der Zellen an Fluss und Scherstress ermöglicht wurde. Folglich kam es nicht zum Ablösen der Zellen aufgrund einer zu raschen Flusssteigerung wie bei *Dunkern et al.* berichtet wurde [168]. In den REM-Aufnahmen zeigte sich die flussbedingte Anpassung besonders deutlich bei den EC, indem diese sich in Richtung des Stromes ausrichteten. Diese Ausrichtung der EC bedingt durch den Scherstress der laminaren Strömung wurde auch bei *Steward et al.* dokumentiert [169]. Die pH-Wert-Messungen in unseren Versuchen ergaben ein deutlich saureres Milieu bei statisch im Vergleich zu dynamisch behandelten Proben. Dies verdeutlichte, dass anaerobe Stoffwechselverhältnisse bei statischer Kultivierung vorlagen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Carrier et al.* war unter dynamischen Bedingungen ein aerober Zellstoffwechsel nachzuweisen [76]. Begründet werden kann dieser Zellmetabolismus unter anderem in dem verbesserten Nährstoff- und Gasaustausch unter dynamischen Bedingungen.

Während der 10-tägigen Konditionierungsphase im Bioreaktor zeigte die zusätzliche EC-Besiedelung deutliche Vorteile gegenüber einer alleinigen FB-Besiedelung. So lösten sich die FB bei einzelnen Proben mit alleiniger FB-Besiedelung flussbedingt von der PU-Oberfläche ab. In den REM-Aufnahmen war bei diesen Proben die FB-Schicht nicht mehr konfluent, sodass die PU-Fasern sichtbar waren. Zusätzlich waren die leichte Zunahme der toten Zellen sowie signifikant erhöhte Entzündungsparameter Interleukin-1a ( $p = 0,03$ ) und -8 ( $p = 0,04$ ) festzustellen. Mit der zusätzlichen EC-Besiedelung lösten sich die Zellen nicht vom PU-Material. Ähnliches konnte in der Studie von *Lee et al.* gezeigt werden [170]: Die von FB gebildete EZM stellte die exzellente Grundlage zur Adhäsion der EC dar. Dabei waren die EC, welche an der EZM angelagert waren,

resistent gegenüber Scherstress und die EC-Schicht war auch nach fünf Wochen im Tierorganismus konfluent. *In-vivo* bestätigen sich diese Beobachtungen: FB und EC sind in Kombination am physiologischen Wandaufbau von z.B. Herzklappen und Gefäßen beteiligt und steigern zusammen das EZM-Wachstum [171]. Und auch in der vorliegenden Arbeit zeigen sich übereinstimmende Ergebnisse. Die Kombination von FB und EC führte unabhängig von den Konditionierungsprozessen zu einer wesentlich stärkeren EZM-Expression. Fibronectin, Elastin sowie Kollagen waren auf FB- und EC-besiedelten Scaffolds deutlich vermehrt nachweisbar als auf PU-Scaffolds, welche alleinig mit FB besiedelt wurden. In der rt-PCR zeigte sich eine signifikant gesteigerte Genexpression von Kollagenen bei FB- und EC-besiedelten Proben sowohl unter statischen ( $p = 0,02$ ) als auch dynamischen Bedingungen ( $p = 0,02$ ).

Mit längerer Kultivierungs- bzw. Konditionierungszeit wurde eine deutliche Steigerung der EZM-Bestandteile dokumentiert. Grund hierfür war unter anderem das stetige Wachstum der Zellpopulation auf den PU-Scaffolds. Ähnliches konnte in der Studie von *Zhang et al.* gezeigt werden, in der statisch kultivierte und dynamisch konditionierte tissue-engineerte Gefäßprothesen verglichen wurden [172]. Dynamische Flussbedingungen führten zu exzellenten Ergebnissen im Hinblick auf Zellproliferation und -metabolismus sowie EZM-Produktion. Diese Proben waren den statisch kultivierten Proben deutlich überlegen. Korrelierend zu diesen Ergebnissen führte in unseren Versuchen die Flusskonditionierung zu einer merklichen Steigerung der EZM-Bestandteile im Vergleich zu statischer Kultivierung. Dies konnte aber nur bei Proben beobachtet werden, welche zusätzlich mit EC besiedelt wurden: Nach sieben Tagen unter pulsatilem Fluss war eine deutlich positive Färbereaktion auf Elastin und Fibronectin in den IF-Färbungen zu verzeichnen. Verglichen mit statisch kultivierten Proben zeigte sich nach Konditionierung eine massive Intensitätszunahme der Färbereaktion auf Elastin und Fibronectin. Ähnliches wurde für die Ausprägung der Kollagen-Matrix in den histologischen Färbungen beobachtet. Bei einzelnen FB- und EC-besiedelten Proben konnten nach der Flusskonditionierung EZM-Bestandteile innerhalb der porösen PU-Wandstrukturen identifiziert werden. Übereinstimmend hierzu zeigte sich in der rt-PCR eine Zunahme der Kollagenexpression ( $p = 0,02$ ) sowie eine Reduktion der Entzündungsparameter ( $p = 0,03$ ) in dynamisch konditionierten, FB- und EC-besiedelten Proben im Vergleich zu dynamisch konditionierten Proben mit alleiniger FB-Besiedelung. Die ausschließlich mit FB besiedelten PU-Scaffolds zeigten aufgrund der Zellablösung unter dynamischen Bedingungen eine signifikante Reduktion der Kollagenexpression ( $p = 0,02$ ). Die Flusskonditionierung ergab bei diesen FB-besie-

delten Scaffolds keinen Vorteil für die Ausbildung der EZM. Eher waren die Reaktionen auf Elastin, Fibronectin und Kollagene in diesen Proben vergleichbar mit den statisch kultivierten Proben. Auch in der rt-PCR war bei diesen dynamisch konditionierten, FB-besiedelten Proben die EZM-Genexpression tendenziell abnehmend und eine signifikante Hochregulation der Entzündungsparameter ( $p = 0,03$  und  $p = 0,04$ ) zu verzeichnen. Somit zeigte sich auch in unseren Versuchen die klare Überlegenheit der dynamischen Flusskonditionierung und zusätzlichen EC-Besiedelung im Hinblick auf die Bildung der EZM. Vergleichend hierzu zeigten die Studien von *Konduri et al.*, dass mechanische Stimuli und ein intaktes Endothelium essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von Herzklappen sind [173]. Statische Bedingungen führten in der nativen Schweineherzklappe zu einem Verlust der EZM-Architektur und einem veränderten Endothelium.

Die mittels der rt-PCR getroffenen Aussagen über die Genexpression der EZM-Bestandteile können in dieser Versuchsreihe bedingt interpretiert werden. Es grenzte sich nur bei einigen Werten eine klare Signifikanz ab. Ein möglicher Grund hierfür ist die Herkunft der isolierten FB und EC. Da die verwendeten Venensegmente anonymisiert wurden, kann nur vermutet werden, dass den Patienten betreffende Faktoren die Zellqualität und Genexpression beeinflussten. Faktoren wie ein höheres Patientenalter bei Herz-Bypass-Operationen, kardiovaskuläre Vorerkrankungen und Multimorbidität können eine Dysfunktion der Zellen bedingen und in einer verminderten EZM-Expression resultieren. In der Literatur bestätigt sich dieses Erkenntnis: Hohes Alter und ein dysfunktionales Endothel begünstigen atherosklerotische Prozesse, welche wiederum ein Umbau in der EZM-Struktur und eine Zellschädigung bedingen [174-176]. Neben der Zellherkunft könnten weitere Einflussfaktoren wie die Lagerung der Venensegmente, die Verweildauer des Venensegmentes bis zur Zellisolierung, die Kultivierung, die Isolierungsmethode und die Kryopräservierung eine Auswirkung auf die EZM-Genexpression gehabt haben. Zusätzlich wurden durch die rt-PCR Veränderungen in der Genexpression ermittelt und miteinander verglichen. Diese Ergebnisse stellen somit relative Werte dar. Ein direkter Vergleich der Nativwerte kann nur bedingt interpretiert werden. In fortführenden Versuchen gilt es diese Methode zu verifizieren. Dennoch konnte in Zusammenschau der Färbungen eine weitgehende Übereinstimmung einiger Ergebnisse der rt-PCR beschrieben und dargestellt werden.

In der Literatur wurde vielfach beschrieben, dass Scherstress in dynamisch konditionierten Proben einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung eines intakten Zell-EZM-Konstruktes hat [177]. In unseren Beobachtungen führte Scherstress bei alleiniger FB-Besiedelung teilweise zum Ablösen der FB. Wurden aber FB- und EC-besiedelte Proben konditioniert, folgte die bessere Zelladhäsion

---

sowie die Produktion von EZM. Somit war zunächst als Voraussetzung zur EC-Adhäsion die optimale Grundlage aus FB und deren gebildete EZM anzunehmen. Diese Beobachtungen korrelierten mit den oben genannten Ergebnissen von *Lee et al.* [170]. Der Scherstress bewirkte die Anpassung der EC an die dynamischen Bedingungen. Dies konnte in den REM-Aufnahmen nachgewiesen werden, wobei die EC sich in Richtung des Flusses orientierten. Ähnliches wurde auch in der Arbeit von *Malek et al.* beobachtet, wobei hier Scherstress zur Formänderung und Ausrichtung der EC führte [178]. Weiterhin konnte in unseren Untersuchungen gezeigt werden, dass die mechanische Stimulation der EC-Schicht in der Änderung der EZM-Zusammensetzung resultierte: Kollagene, die Bestandteil der physiologischen Basalmembran sind, waren nach Flusskonditionierung bei zusätzlich EC-besiedelten Proben vermehrt nachzuweisen. Neben der Zunahme an Kollagenen war auch die vermehrte Bildung von Fibronectin und Elastin zu dokumentieren. Diese von FB und EC gebildete EZM stellte wiederum eine stabile Struktur für proliferierende FB und EC dar. Andere Studien konnten zusätzlich zeigen, dass Scherstress positive Auswirkungen auf die Zell-Zell-Kontakte hat [179]: So induzierte Scherstress die Bildung des FB-Wachstumsfaktors in EC [180].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung einer EZM auf zellbesiedelten PU-Scaffolds *in-vitro* analysiert. Die systematische Untersuchung der Besiedelungs- und Konditionierungsregimes zeigte, dass die Kombination aus der EC-Schicht und Flusskonditionierung zu einer vermehrten EZM-Bildung führte. Somit konnte die Bildung einer EZM als potenzielles kardiovaskuläres Ersatzgewebe optimiert werden. Basierend auf gewonnenen Erkenntnissen kann zukünftig der Ersatz erkrankter, kardiovaskulärer Strukturen durch tissue-engineertes Gewebe erreicht werden. In fortführenden Arbeiten gilt es, dieses Gewebe unter physiologischen linksventrikulären Bedingungen *in-vivo* zu untersuchen.

## 8 Zusammenfassung

Tissue Engineering stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung von kardiovaskulärem Ersatzgewebe dar. Entscheidend ist der *in-vitro* Aufbau einer vitalen extrazellulären Matrix. Diese Matrix wird von Zellen gebildet, welche auf ein Trägermaterial wie synthetisches Polyurethan besiedelt werden. Dadurch entsteht vitales Ersatzgewebe, welches Wachstum, Regeneration und Entwicklung des tissue-engineerten Konstruktes zu gesundem, kardiovaskulärem Gewebe ermöglicht. Vorliegende Versuche analysierten das Ausmaß der Bildung der extrazellulären Matrix auf zellbesiedeltem Polyurethan. In Abhängigkeit von zusätzlicher Endothelzell-Besiedelung und der Flusskonditionierung im Bioreaktor konnten unterschiedliche Ausprägungen der extrazellulären Matrix beobachtet werden.

Im Vergleich zu statisch kultivierten Proben konnte nach der Konditionierung unter pulsatilem Fluss eine wesentliche Steigerung der Bestandteile der extrazellulären Matrix beobachtet werden. Dies wurde aber nur bei Proben nachgewiesen, welche zusätzlich mit Endothelzellen beschichtet wurden. Hier zeigte sich die Ausrichtung der Endothelzellen in Richtung des Flusses im Sinne einer Anpassung der Zellen an den Scherstress. Zusätzlich konnten vermehrt Matrixbestandteile nachgewiesen werden. Die aerobe Stoffwechsellage bei dynamisch konditionierten, Endothelzell-besiedelten Proben begünstigte zusätzlich die Bildung der extrazellulären Matrix. Die alleinige Besiedelung mit Fibroblasten hingegen führte unter Scherstress-Bedingungen teilweise zu einem Ablösen der Fibroblasten. Folglich erbrachte die Flusskonditionierung bei alleiniger Fibroblasten-Besiedelung keinen Vorteil. Im Gegenteil zeigte sich eher eine vergleichbare Expression von Matrixbestandteilen wie nach statischer Kultivierung. Als essentiell zur Ausbildung der extrazellulären Matrix erwies sich somit die Endothelzell-Besiedelung und folgend die dynamische Konditionierung. Dennoch stellte die initiale Fibroblasten-Besiedelung die ideale Grundlage für die nachfolgende Endothelzell-Adhäsion dar. Beide Zelltypen sind am physiologischen Wandaufbau von kardiovaskulären Wandstrukturen beteiligt und beeinflussen gemeinsam die Bildung der extrazellulären Matrix. Physiologische Stimuli in Form des pulsatilem Flusses, welcher Scherstress an der Zelloberfläche induzierte, bewirkte die Modulation und Reaktion der Zellen. Dies hatte eine vermehrte Ausprägung von Matrixbestandteilen zur Folge.

---

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer vitalen extrazellulären Matrixstruktur auf zellbesiedelten, konditionierten Polyurethan-Scaffolds *in-vitro* realisierbar ist. Durch Analyse der unterschiedlichen Besiedelungs- und Konditionierungsprozesse konnte eine gesteigerte extrazelluläre Matrixbildung unter Endothelzell-Besiedelung und pulsatilem Fluss beobachtet werden. Weiterhin waren eine verlängerte Ruhezeit nach den Besiedelungsprozessen und die langsame Adaptation an den pulsatilem Fluss vorteilhaft für die Matrixbildung. Die angewandten Methoden zeigen vielversprechende Ergebnisse zur Verbesserung der Herstellung eines implantierfähigen, robusten tissue-engineerten Gewebes mit Regenerationspotenzial. In fortführenden Versuchen gilt es, dies auch unter physiologischen Bedingungen zu validieren. Zukünftig könnten nach den Prinzipien des Tissue Engineerings hergestellte Implantate zum Ersatz von kardiovaskulärem Gewebe und Organen führen. Dies ist in Anbetracht gegebener Einschränkungen vorhandener Therapiemöglichkeiten und der hohen Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung und daher von fortwährendem Interesse aktueller Forschungsvorhaben.

## 9 Literaturverzeichnis

1. *Fact Sheet to Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
2. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. 3(11).
3. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. European Heart Journal, 2003. 24(13): p. 1231-1243.
4. Boudoulas, K.D., J.S. Borer, and H. Boudoulas, *Etiology of valvular heart disease in the 21st century*. Cardiology, 2013. 126(3): p. 139-52.
5. Steer, A.C. and J.R. Carapetis, *Prevention and treatment of rheumatic heart disease in the developing world*. Nat Rev Cardiol, 2009. 6(11): p. 689-98.
6. Karthikeyan, G. and B.M. Mayosi, *Is primary prevention of rheumatic fever the missing link in the control of rheumatic heart disease in Africa?* Circulation, 2009. 120(8): p. 709-13.
7. Iung, B. and A. Vahanian, *Valvular heart diseases in elderly people*. Lancet, 2006. 368(9540): p. 969-71.
8. Cresti, A., et al., *Epidemiological and mortality trends in infective endocarditis, a 17-year population-based prospective study*. Cardiovasc Diagn Ther, 2017. 7(1): p. 27-35.
9. Butcher, J.T., G.J. Mahler, and L.A. Hockaday, *Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. 63(4-5): p. 242-68.
10. Nishimura, R.A., et al., *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*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. 148(1): p. e1-e132.
11. Yacoub, M.H. and J.J.M. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. 2(2): p. 60-61.
12. Sun, J.C., et al., *Antithrombotic management of patients with prosthetic heart valves: current evidence and future trends*. Lancet, 2009. 374(9689): p. 565-76.
13. Fedeli, U., et al., *Increasing incidence and mortality of infective endocarditis: a population-based study through a record-linkage system*. BMC Infect Dis, 2011. 11: p. 48.
14. Aslam, A.K., et al., *Prosthetic heart valves: types and echocardiographic evaluation*. Int J Cardiol, 2007. 122(2): p. 99-110.
15. Butany, J., et al., *Biological replacement heart valves. Identification and evaluation*. Cardiovasc Pathol, 2003. 12(3): p. 119-39.

16. Unger, F., et al., *Standards and concepts in valve surgery. A report of the task force of european heart institute (EHI) of the european academy of sciences and arts and the international society of cardiothoracic surgeons (ISCTS)*. Thorac Cardiovasc Surg, 2000. 48(3): p. 175-82.
17. Perler, B.A., et al., *Carotid Dacron patch angioplasty: immediate and long-term results of a prospective series*. Cardiovasc Surg, 1995. 3(6): p. 631-6.
18. Naylor, R., et al., *Randomized trial of vein versus dacron patching during carotid endarterectomy: long-term results*. J Vasc Surg, 2004. 39(5): p. 985-93; discussion 993.
19. Desai, M., A.M. Seifalian, and G. Hamilton, *Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2011. 40(2): p. 394-398.
20. Kannan, R.Y., et al., *Current status of prosthetic bypass grafts: a review*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. 74(1): p. 570-81.
21. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Heart regeneration*. Nature, 2011. 473(7347): p. 326-35.
22. Hamour, I.M., et al., *Current outcome of heart transplantation: a 10-year single centre perspective and review*. Qjm, 2011. 104(4): p. 335-43.
23. Wilhelm, M.J., *Long-term outcome following heart transplantation: current perspective*. J Thorac Dis, 2015. 7(3): p. 549-51.
24. Tschope, C., et al., *[Treatment of chronic heart failure: what's not (yet) in the guidelines]*. Dtsch Med Wochenschr, 2015. 140(6): p. 406-12.
25. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.
26. Shinoka, T. and H. Miyachi, *Current Status of Tissue Engineering Heart Valve*. World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery, 2016. 7(6): p. 677-684.
27. Fallahiazouard, E., et al., *A review of: application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. 48: p. 556-65.
28. Maxfield, M.W., M.A. Cleary, and C.K. Breuer, *Chapter 40 - Tissue-Engineering Heart Valves A2 - Lanza, Robert*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Langer and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 813-833.
29. Chiquet, M., *Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress*. Matrix Biol, 1999. 18(5): p. 417-26.
30. Takawale, A., S.S.V.P. Sakamuri, and Z. Kassiri, *Extracellular Matrix Communication and Turnover in Cardiac Physiology and Pathology*, in *Comprehensive Physiology*. 2011, John Wiley & Sons, Inc.
31. Tsang, K.Y., et al., *The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation*. Cell Tissue Res, 2010. 339(1): p. 93-110.
32. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. 97: p. 4-27.
33. Yue, B., *Biology of the Extracellular Matrix: An Overview*. Journal of glaucoma, 2014: p. S20-S23.



34. Davis, G.E. and D.R. Senger, *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. *Circ Res*, 2005. 97(11): p. 1093-107.
35. Chan, B.P. and K.W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. *Eur Spine J*, 2008. 17 Suppl 4: p. 467-79.
36. Haverich, A. and M. Wilhelmi, *Kardiovaskuläres "tissue engineering"*, in *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen*. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 111-133.
37. Meyer, U., *The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective*, in *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, U. Meyer, et al., Editors. 2009, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 5-12.
38. Mayer, J.E., Jr., T. Shin'oka, and D. Shum-Tim, *Tissue engineering of cardiovascular structures*. *Curr Opin Cardiol*, 1997. 12(6): p. 528-32.
39. Wintermantel, E., et al., *Biokompatibilität, in Medizintechnik Life Science Engineering*. 2008, Springer. p. 59-96.
40. Miller, M.J. and C.W. Patrick, Jr., *Tissue engineering*. *Clin Plast Surg*, 2003. 30(1): p. 91-103, vii.
41. Vacanti, J.P. and C.A. Vacanti, *Chapter 1 - The History and Scope of Tissue Engineering*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. 2014, Academic Press: Boston. p. 3-8.
42. Dohmen, P.M. and W. Konertz, *Tissue-engineered heart valve scaffolds*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. 15(6): p. 362-7.
43. Sacks, M.S., F.J. Schoen, and J.E. Mayer, *Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009. 11: p. 289-313.
44. Sodian, R., et al., *Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves*. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. Iii22-9.
45. Hoerstrup, S.P., et al., *Functional living trileaflet heart valves grown in vitro*. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. Iii44-9.
46. Zhang, X., et al., *Application of hydrogels in heart valve tissue engineering*. *J Long Term Eff Med Implants*, 2015. 25(1-2): p. 105-34.
47. Naderi, H., M.M. Matin, and A.R. Bahrami, *Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems*. *J Biomater Appl*, 2011. 26(4): p. 383-417.
48. Theodoridis, K., et al., *Successful matrix guided tissue regeneration of decellularized pulmonary heart valve allografts in elderly sheep*. *Biomaterials*, 2015. 52: p. 221-8.
49. Akhyari, P., et al., *[Tissue engineering of heart valves]*. *Chirurg*, 2011. 82(4): p. 311-8.
50. Cheung, D.Y., B. Duan, and J.T. Butcher, *Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. 15(8): p. 1155-72.
51. Sutherland, F.W., et al., *From stem cells to viable autologous semilunar heart valve*. *Circulation*, 2005. 111(21): p. 2783-91.

52. Sodian, R., et al., *Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves*. *Asaio j*, 2000. 46(1): p. 107-10.
53. Raghunath, J., et al., *Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007. 46(Pt 2): p. 73-84.
54. Cebotari, S., et al., *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells*. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I132-7.
55. Schnell, A.M., et al., *Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2001. 49(4): p. 221-5.
56. Weiner, L.P., *Definitions and criteria for stem cells*. *Methods Mol Biol*, 2008. 438: p. 3-8.
57. Alsberg, E., H.A. von Recum, and M.J. Mahoney, *Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications*. *Expert Opin Biol Ther*, 2006. 6(9): p. 847-66.
58. Towns, C.R. and D.G. Jones, *Stem cells, embryos, and the environment: a context for both science and ethics*. *J Med Ethics*, 2004. 30(4): p. 410-3.
59. Weber, B., M.Y. Emmert, and S.P. Hoerstrup, *Stem cells for heart valve regeneration*. *Swiss Med Wkly*, 2012. 142: p. w13622.
60. Siepe, M., et al., *Stem cells used for cardiovascular tissue engineering*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2008. 34(2): p. 242-247.
61. Forsberg, M. and O. Hovatta, *Challenges for the Therapeutic use of Pluripotent Stem Derived Cells*. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 19.
62. Zhang, F., F. Citra, and D.A. Wang, *Prospects of induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2011. 17(2): p. 115-24.
63. Lichtenberg, A., et al., *Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions*. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I559-65.
64. Teebken, O.E., M. Wilhelmi, and A. Haverich, *Tissue Engineering für Herzklappen und Gefäße*. *Der Chirurg*, 2005. 76(5): p. 453-466.
65. Zund, G., et al., *Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1998. 13(2): p. 160-4.
66. Villalona, G.A., et al., *Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. 16(3): p. 341-50.
67. Mol, A., et al., *Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges*. *Expert Rev Med Devices*, 2009. 6(3): p. 259-75.
68. Nasserri, B.A., et al., *Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation*. *Tissue Eng*, 2003. 9(2): p. 291-9.
69. Schoen, F.J., *Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves*. *Annu Rev Pathol*, 2012. 7: p. 161-83.

70. Sacks, M.S., W. David Merryman, and D.E. Schmidt, *On the biomechanics of heart valve function*. J Biomech, 2009. 42(12): p. 1804-24.
71. Schoen, F.J., *Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering*. Circulation, 2008. 118(18): p. 1864-80.
72. Parvin Nejad, S., et al., *Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good thing?* Adv Drug Deliv Rev, 2016. 96: p. 161-75.
73. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 2004. 22(2): p. 80-86.
74. Martin, Y. and P. Vermette, *Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances*. Biomaterials, 2005. 26(35): p. 7481-503.
75. Kim, B.S., et al., *Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices*. Biotechnol Bioeng, 1998. 57(1): p. 46-54.
76. Carrier, R.L., et al., *Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization*. Biotechnol Bioeng, 1999. 64(5): p. 580-9.
77. Haisch, A., *Bioreaktoren in der Gewebekultur*. HNO, 2008. 56(4): p. 373-375.
78. Niklason, L.E., et al., *Functional arteries grown in vitro*. Science, 1999. 284(5413): p. 489-93.
79. Sodian, R., et al., *Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences*. Ann Thorac Surg, 2000. 70(1): p. 140-4.
80. Chmiel, H., *Bioreaktoren*, in *Bioprozesstechnik*, H. Chmiel, Editor. 2011, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 197-236.
81. Sodian, R. and R. Hetzer, *Tissue Engineering in der Herzchirurgie*. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, 2004. 18(1): p. 57-63.
82. Gandaglia, A., et al., *Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. 39(4): p. 523-31.
83. Shinoka, T., et al., *Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model*. Ann Thorac Surg, 1995. 60(6 Suppl): p. S513-6.
84. Sanz-Garcia, A., et al., *Heart valve tissue engineering: how far is the bedside from the bench?* Expert Rev Mol Med, 2015. 17: p. e16.
85. Gottlieb, D., et al., *In vivo monitoring of function of autologous engineered pulmonary valve*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. 139(3): p. 723-31.
86. Schmidt, D., et al., *Minimally-invasive implantation of living tissue engineered heart valves: a comprehensive approach from autologous vascular cells to stem cells*. J Am Coll Cardiol, 2010. 56(6): p. 510-20.
87. Robinson, P.S., et al., *Functional tissue-engineered valves from cell-remodeled fibrin with commissural alignment of cell-produced collagen*. Tissue Eng Part A, 2008. 14(1): p. 83-95.

88. Flanagan, T.C., et al., *In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model*. Tissue Eng Part A, 2009. 15(10): p. 2965-76.
89. Syedain, Z., et al., *6-month aortic valve implantation of an off-the-shelf tissue-engineered valve in sheep*. Biomaterials, 2015. 73: p. 175-84.
90. Dohmen, P.M., et al., *Ross operation with a tissue-engineered heart valve*. Ann Thorac Surg, 2002. 74(5): p. 1438-42.
91. Dohmen, P.M., et al., *Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve*. Ann Thorac Surg, 2011. 92(4): p. 1308-14.
92. Zehr, K.J., et al., *Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. 130(4): p. 1010-5.
93. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. 23(6): p. 1002-6; discussion 1006.
94. Kasimir, M.T., et al., *Presence and elimination of the xenoantigen gal ( $\alpha$ 1, 3) gal in tissue-engineered heart valves*. Tissue Eng, 2005. 11(7-8): p. 1274-80.
95. Khorramirouz, R., et al., *Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits*. Adv Med Sci, 2014. 59(2): p. 299-307.
96. Namiri, M., et al., *Engineering natural heart valves: possibilities and challenges*. J Tissue Eng Regen Med, 2016.
97. Iop, L. and G. Gerosa, *Guided tissue regeneration in heart valve replacement: from preclinical research to first-in-human trials*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 432901.
98. Emmert, M.Y. and S.P. Hoerstrup, *Tissue engineered heart valves: moving towards clinical translation*. Expert Rev Med Devices, 2016. 13(5): p. 417-9.
99. Weber, B., et al., *Injectable living marrow stromal cell-based autologous tissue engineered heart valves: first experiences with a one-step intervention in primates*. Eur Heart J, 2011. 32(22): p. 2830-40.
100. Emmert, M.Y., et al., *Transcatheter aortic valve implantation using anatomically oriented, marrow stromal cell-based, stented, tissue-engineered heart valves: technical considerations and implications for translational cell-based heart valve concepts*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. 45(1): p. 61-8.
101. Dijkman, P.E., et al., *Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts*. Biomaterials, 2012. 33(18): p. 4545-54.
102. Conradi, L., et al., *Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement: a propensity score analysis in patients at high surgical risk*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. 143(1): p. 64-71.
103. Driessen-Mol, A., et al., *Transcatheter implantation of homologous "off-the-shelf" tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep*. J Am Coll Cardiol, 2014. 63(13): p. 1320-9.

104. Ghista, D.N. and H. Reul, *Optimal prosthetic aortic leaflet valve: design parametric and longevity analyses: development of the Avcothane-51 leaflet valve based on the optimum design analysis*. J Biomech, 1977. 10(5-6): p. 313-24.
105. Jana, S., et al., *Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves*. Acta Biomater, 2014. 10(7): p. 2877-93.
106. Goldman, S., et al., *Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(11): p. 2149-56.
107. Alexander, J.H. and P.K. Smith, *Coronary-Artery Bypass Grafting*. New England Journal of Medicine, 2016. 374(20): p. 1954-1964.
108. Smit, F.E. and P.M. Dohmen, *Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now?* Med Sci Monit Basic Res, 2015. 21: p. 1-3.
109. Gosev, I. and M. Leacche, *Hybrid coronary revascularization: the future of coronary artery bypass surgery or an unfulfilled promise?* Circulation, 2014. 130(11): p. 869-71.
110. Roll, S., et al., *Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery-systematic review and meta-analysis*. BMC Surg, 2008. 8: p. 22.
111. Takagi, H., et al., *A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting*. J Vasc Surg, 2010. 52(1): p. 232-6.
112. Green, R.M., et al., *Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial*. J Vasc Surg, 2000. 31(3): p. 417-25.
113. Friedman, S.G., et al., *A prospective randomized comparison of Dacron and polytetrafluoroethylene aortic bifurcation grafts*. Surgery, 1995. 117(1): p. 7-10.
114. Rychlik, I.J., et al., *A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass*. J Vasc Surg, 2014. 60(2): p. 506-15.
115. Donaldson, M.C., J.A. Mannick, and A.D. Whittemore, *Femoral-distal bypass with in situ greater saphenous vein. Long-term results using the Mills valvulotome*. Ann Surg, 1991. 213(5): p. 457-64; discussion 464-5.
116. Xue, L. and H.P. Greisler, *Biomaterials in the development and future of vascular grafts*. J Vasc Surg, 2003. 37(2): p. 472-80.
117. Laube, H.R., et al., *Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. 120(1): p. 134-41.
118. Deutsch, M., et al., *Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience*. Surgery, 1999. 126(5): p. 847-55.
119. Salacinski, H.J., et al., *The mechanical behavior of vascular grafts: a review*. J Biomater Appl, 2001. 15(3): p. 241-78.
120. Abbott, W.M., et al., *Effect of compliance mismatch on vascular graft patency*. J Vasc Surg, 1987. 5(2): p. 376-82.
121. Tai, N.R., et al., *Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction*. Br J Surg, 2000. 87(11): p. 1516-24.

122. Miwa, H. and T. Matsuda, *An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses*. J Vasc Surg, 1994. 19(4): p. 658-67.
123. Tiwari, A., et al., *New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes*. Cardiovasc Surg, 2002. 10(3): p. 191-7.
124. Seifalian, A.M., et al., *Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering*. Artif Organs, 2002. 26(4): p. 307-20.
125. Isomatsu, Y., et al., *Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. 126(6): p. 1958-62.
126. Kurobe, H., et al., *Concise review: tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future*. Stem Cells Transl Med, 2012. 1(7): p. 566-71.
127. Niu, G., E. Sapoznik, and S. Soker, *Bioengineered blood vessels*. Expert Opin Biol Ther, 2014. 14(4): p. 403-10.
128. Shin'oka, T., Y. Imai, and Y. Ikada, *Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery*. N Engl J Med, 2001. 344(7): p. 532-3.
129. Shinoka, T. and C. Breuer, *Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery*. Yale J Biol Med, 2008. 81(4): p. 161-6.
130. Hibino, N., et al., *Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. 139(2): p. 431-6, 436.e1-2.
131. Dahl, S.L., et al., *Readily available tissue-engineered vascular grafts*. Sci Transl Med, 2011. 3(68): p. 68ra9.
132. Weinberg, C.B. and E. Bell, *A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells*. Science, 1986. 231(4736): p. 397-400.
133. L'Heureux, N., et al., *A completely biological tissue-engineered human blood vessel*. Faseb j, 1998. 12(1): p. 47-56.
134. Wilson, G.J., et al., *Acellular matrix allograft small caliber vascular prostheses*. ASAIO Trans, 1990. 36(3): p. M340-3.
135. Wilson, G.J., et al., *Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement*. Ann Thorac Surg, 1995. 60(2 Suppl): p. S353-8.
136. Teebken, O.E., A.M. Pichlmaier, and A. Haverich, *Cell Seeded Decellularised Allogeneic Matrix Grafts and Biodegradable Polydioxanone-prostheses Compared with Arterial Autografts in a Porcine Model*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2001. 22(2): p. 139-145.
137. Conklin, B.S., et al., *Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft*. Med Eng Phys, 2002. 24(3): p. 173-83.
138. Katzman, H.E., et al., *Multicenter Evaluation of the Bovine Mesenteric Vein Bioprosthesis for Hemodialysis Access in Patients with an Earlier Failed Prosthetic Graft*. Journal of the American College of Surgeons, 2005. 201(2): p. 223-230.
139. Leor, J., et al., *Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?* Circulation, 2000. 102(19 Suppl 3): p. Iii56-61.

140. Radisic, M., et al., *Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(52): p. 18129-34.
141. Radisic, M., et al., *Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds*. Tissue Eng, 2006. 12(8): p. 2077-91.
142. Ozawa, T., et al., *Tissue-engineered grafts matured in the right ventricular outflow tract*. Cell Transplant, 2004. 13(2): p. 169-77.
143. Godier-Furnemont, A.F., et al., *Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(19): p. 7974-9.
144. Zimmermann, W.H., I. Melnychenko, and T. Eschenhagen, *Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts*. Biomaterials, 2004. 25(9): p. 1639-47.
145. Jawad, H., et al., *Myocardial tissue engineering: a review*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. 1(5): p. 327-42.
146. Jawad, H., et al., *Myocardial tissue engineering*. Br Med Bull, 2008. 87: p. 31-47.
147. Vunjak Novakovic, G., T. Eschenhagen, and C. Mummery, *Myocardial tissue engineering: in vitro models*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. 4(3).
148. H Reneker, D. and I. Chun, *Nanometre Diameter Fibres of Polymer, Produced by Electrospinning*. Vol. 7. 1996. 216-223.
149. Nair, L.S., S. Bhattacharyya, and C.T. Laurencin, *Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning*. Expert Opin Biol Ther, 2004. 4(5): p. 659-68.
150. Konig, F., et al., *A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization*. J Funct Biomater, 2012. 3(3): p. 480-96.
151. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
152. Mol, A., et al., *Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application*. Circulation, 2006. 114(1 Suppl): p. I152-8.
153. Bader, A., et al., *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg, 1998. 14(3): p. 279-84.
154. Mariscal, A., et al., *A fluorescence bioassay to detect residual formaldehyde from clinical materials sterilized with low-temperature steam and formaldehyde*. Biologicals, 2005. 33(3): p. 191-6.
155. Wheatley, D.J., et al., *Polyurethane: material for the next generation of heart valve prostheses?* Eur J Cardiothorac Surg, 2000. 17(4): p. 440-8.
156. Zhu, L., et al., *Effective endothelialization of polyurethane surfaces. Response to shear stress and platelet adhesion*. ASAIO Trans, 1990. 36(4): p. 811-6.
157. Walluscheck, K.P., et al., *Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. 12(3): p. 321-30.

- 
158. Ortenwall, P., et al., *Endothelial cell seeding reduces thrombogenicity of Dacron grafts in humans*. J Vasc Surg, 1990. 11(3): p. 403-10.
159. He, W., et al., *The preparation and performance of a new polyurethane vascular prosthesis*. Cell Biochem Biophys, 2013. 66(3): p. 855-66.
160. Janik, H. and M. Marzec, *A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. 48: p. 586-91.
161. Bergmeister, H., et al., *Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities*. Acta Biomater, 2013. 9(4): p. 6032-40.
162. White, R.A., *The effect of porosity and biomaterial on the healing and long-term mechanical properties of vascular prostheses*. ASAIO Trans, 1988. 34(2): p. 95-100.
163. Bergmeister, H., et al., *Electrospun small-diameter polyurethane vascular grafts: ingrowth and differentiation of vascular-specific host cells*. Artif Organs, 2012. 36(1): p. 54-61.
164. Radisic, M., et al., *High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering*. Biotechnol Bioeng, 2003. 82(4): p. 403-14.
165. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage*. J Orthop Res, 1999. 17(1): p. 130-8.
166. Aleksieva, G., et al., *Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering*. Biomed Eng Online, 2012. 11: p. 92.
167. Lichtenberg, A., et al., *In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions*. Biomaterials, 2006. 27(23): p. 4221-9.
168. Dunkern, T.R., et al., *A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1999. 18(2): p. 105-10.
169. Steward, R., Jr., et al., *Fluid shear, intercellular stress, and endothelial cell alignment*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. 308(8): p. C657-64.
170. Lee, Y.S., et al., *Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel*. Asaio j, 1993. 39(3): p. M740-5.
171. Chester, A.H. and P.M. Taylor, *Molecular and functional characteristics of heart-valve interstitial cells*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007. 362(1484): p. 1437-1443.
172. Zhang, X., et al., *Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts*. Biomaterials, 2009. 30(19): p. 3213-23.
173. Konduri, S., et al., *Normal physiological conditions maintain the biological characteristics of porcine aortic heart valves: an ex vivo organ culture study*. Ann Biomed Eng, 2005. 33(9): p. 1158-66.
174. Lakatta, E.G. and D. Levy, *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease*. Circulation, 2003. 107(1): p. 139-46.



- 
175. Reriani, M.K., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors*. Biomarkers in medicine, 2010. 4(3): p. 351-360.
  176. Xu, J. and G.-P. Shi, *Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2014. 1842(11): p. 2106-2119.
  177. Riha, G.M., et al., *Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation*. Ann Biomed Eng, 2005. 33(6): p. 772-9.
  178. Malek, A.M. and S. Izumo, *Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress*. J Cell Sci, 1996. 109 ( Pt 4): p. 713-26.
  179. Kong, Q. and M. Vazquez, *Flow-induced shear stresses increase the number of cell-cell contacts within extracellular matrix*. J Biomed Mater Res A, 2009. 89(4): p. 968-79.
  180. Gloe, T., et al., *Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3*. J Biol Chem, 2002. 277(26): p. 23453-8.

# 10 Anhang

## 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der mechanischen Eigenschaften eines resorbierbaren Scaffolds und der Matrix.....	13
Abbildung 3.2: Scaffoldmaterialien für tissue-engineerte Herzklappen.....	20
Abbildung 3.3: Beispiele des Gefäßersatzes.....	23
Abbildung 5.1: Einseitige Kanülierung des Venenstückes und Auftreiben mit der „Spüllösung“.....	26
Abbildung 5.2: Deckglasmethode zur Gewinnung von FB.....	27
Abbildung 5.3: Phasenmikroskopische Aufnahmen von Zellkulturen in T175-Zellkulturflaschen.....	28
Abbildung 5.4: Darstellung des Schemas zum Passagieren von EC und FB.....	30
Abbildung 5.5: PU-Zylinder und PU-Teflonkonstruktion für die Besiedelung.....	32
Abbildung 5.6: Besiedelungsbioreaktor.....	35
Abbildung 5.7: Einteilung der Versuchsgruppen G1 - G4 (n = 5).....	35
Abbildung 5.8: Statische Kultivierung und dynamische Konditionierung.....	38
Abbildung 5.9: Prozess der Probenaufbereitung für die REM.....	40
Abbildung 5.10: Ablauf der Probenvorbereitung für IF- und histologische Färbungen.....	44
Abbildung 6.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbeschichtetem PU-Material.....	50
Abbildung 6.2: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach dem Zellbesiedelungsprozess.....	52
Abbildung 6.3: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach sieben Tagen statischer Kultivierung (G1 und G3).....	54
Abbildung 6.4: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Innenseite des PU-Zylinders nach sieben Tagen dynamischer Konditionierung (G2 und G4).....	56
Abbildung 6.5: Repräsentative fluoreszenzzytologische Aufnahmen gegen TE-7 (FB-spezifischer Marker, rot), vWF (EC-spezifischer Marker, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).....	57
Abbildung 6.6: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach dem Zellbesiedelungsprozess.....	59
Abbildung 6.7: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach sieben Tagen statischer Kultivierung (G1 und G3).....	60
Abbildung 6.8: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische LD-Aufnahmen nach sieben Tagen dynamischer Konditionierung (G2 und G4).....	61

Abbildung 6.9: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen TE-7 (FB-spezifischer Marker, rot) und DAPI (DNA-Marker, blau).....	63
Abbildung 6.10: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen vWF (EC-spezifischer Marker, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).....	65
Abbildung 6.11: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen Elastin (Anti-Elastin, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).....	67
Abbildung 6.12: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gegen Fibronectin (Anti-Fibronectin, grün) und DAPI (DNA-Marker, blau).....	69
Abbildung 6.13: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen nach histologischer Pikrosiriusrot-Färbung.....	72
Abbildung 6.14: rt-PCR zur Auswirkung der Flusskonditionierung auf die Genexpression bei FB-besiedelten Proben.....	74
Abbildung 6.15: rt-PCR zur Auswirkung der Flusskonditionierung auf die Genexpression bei FB- und zusätzlich EC-besiedelten Proben.....	76
Abbildung 6.16: rt-PCR zur Auswirkung der EC-Beschichtung auf die Genexpression.....	77
Abbildung 10.1: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FB-besiedelten PU-Patches.....	109
Abbildung 10.2: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EC-besiedelten PU-Patches.....	109
Abbildung 10.3: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von nicht-gassterilisiertem (A) und gassterilisiertem (B) PU-Material.....	110
Abbildung 10.4: Gelelektrophorese der RNA-Proben.....	112

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Tabelle zur Veranschaulichung der Reagenzien beim Trypsinieren.....	29
Tabelle 5.2: Erläuterung der Formel.....	33
Tabelle 6.1: Überblick der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	57
Tabelle 6.2: Überblick der LD-Färbungen.....	62
Tabelle 6.3: Überblick der IF-Färbungen gegen Elastin.....	68
Tabelle 6.4: Überblick der IF-Färbungen gegen Fibronectin.....	70
Tabelle 6.5: Überblick der histologischen Färbung.....	73
Tabelle 6.6: pH-Wert-Messungen.....	78
Tabelle 10.1: Zellauszählungen nach Besiedelung.....	111

## 10.3 Materialien

### Lösungen/Medien/Reagenzien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
2xRT <sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix	Qiagen GmbH, Hilden, GER	330600
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	A9539-100G
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, GER	1214482
Argongas	Linde AG, München, GER	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	A7906-100G
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	D5879-100ML
Eindeckmedium (CV Ultra Mounting Medium)	Leica GmbH, Wetzlar, GER	14070937891
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C-22010
Ethanol 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 99,9%	Apotheke des Klinikums Großhadern, München, GER	
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	E5134
Fermacidal D2 (Desinfektionsmittel für Arbeitsflächen)	IC Products SA, Minusio, SUI	222.010
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, GER	S 0115
Fibroblast Growth Medium	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C-23010
Gentamycin 10 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, GER	15750-037
Glutaraldehyd 25%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	G 400-4
HCl (1 N)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	7647-01-0
Heparin, 25.000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	PZN-3029843
Heparin, 5.000 I.E./0,2 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, GER	PZN-3170642
Humanes Serum Albumin (HSA) 20%	Baxter GmbH, Unterschleißheim, GER	6861364
Kollagenase Typ 2, CLS-2 (300 U/mg)	Worthington Biochemical Corporation/CellSystems GmbH, St. Katharinen, GER	43J14366B
Medium199 Earle's	Biochrom AG, Berlin, GER	F0665
Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	4227.3
Mounting Medium	Ibidi GmbH, München, GER	50001
Natrium-Cacodylat Trihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	C4945
Natriumcitrat Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	W302600

Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	71687
Penicillin-Streptomycin Solution, stabilized	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	P4458-100ML
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, GER	L1825
Proteinase K Ready-to-use	Dako GmbH, Glostrup, DK	S3020
Reagent DX Antifoam	Qiagen GmbH, Hilden, GER	19088
RNeasy Mini Kit 50	Qiagen GmbH, Hilden, GER	74104
Roti-Histofix 4% (Formaldehydlösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	P087.3
RT2 First Strand Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden, GER	3304404
Stickstoff	Linde AG, München, GER	
Sudanschwarz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	0292.1
Tris-Borate-EDTA Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	T4415-1L
TritonX-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	X-100
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	T8154
Trypsin-EDTA (Ethylendiaminetetraacetic acid) solution (10x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	T-4174-100ML
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	9713.3
Zitronensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	7624.1

### Färbemittel

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	D9542
Färbekit Pikrosiriusrot	Morphisto GmbH, Frankfurt, GER	13425
GelRed Nucleic Acid Stain	Biotium, Inc., Fremont, USA	41003
Hämatoxylinlösung B n. Weigert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	X907.1
Propidiumjodid (PI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	81845
Syto9 (5 mM in DMSO)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER	S-34854

### Immunfluoreszenz-Antikörper

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Elastin	Abcam plc, Cambridge, England	ab21610
Anti-Fibronectin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	F3648

Anti-TE-7	Millipore Corporation, MA, USA	CBL271
Anti-vWF	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	HPA001815
Esel-Anti-Maus IgG H&L (Alexa Fluor 555)	Abcam plc, Cambridge, England	ab150110
Ziege-Anti-Kaninchen IgG H&L (CF488A)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	SAB4600234

### Zusammensetzung der Medien, Reagenzien und Färbemittel

Artikel	Reagenz	Menge
Blockingpuffer	Fetal Calf Serum (FCS)	15 ml (10%)
	Bovines Serumalbumin (BSA)	6 g (4%)
Endothelial Cell Growth Medium (6% FCS) Lagerung bei 2 - 8°C	Endothelial Cell Growth Medium	500 ml
	Fetal Calf Serum (FCS)	30 ml
	Supplement für Endothelial Cell Growth Medium	12 ml
	Penicillin-Streptomycin Solution, stabilized	1 ml
DAPI	DAPI 1:1000 in PBS verdünnt	
Demaskierung Citratpuffer	Acqua destillata	450 ml
	Natriumcitrat Dihydrat 0,1 M	41 ml
	Zitronensäure	9 ml
Demaskierung 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	186,12 g
	H <sub>2</sub> O	800 ml
	Natriumhydroxid	Ca. 20 g (bis pH 8,0)
	H <sub>2</sub> O	Bis 1 l auffüllen
	→ von ergebender Lösung 4 ml in 2 l Ampuwa	
Detergenzlösung zur Permeabilisierung (in PBS)	TritonX-100 0,5% in	
	Fetal Calf Serum (FCS)	15 ml (10%)
	Bovines Serumalbumin (BSA)	3 g (2%)
Endothelial Cell Growth Medium (6% FCS) Lagerung bei 2 - 8°C	Endothelial Cell Growth Medium	500 ml
	Fetal Calf Serum (FCS)	30 ml
	Supplement für Endothelial Cell Growth Medium	12 ml
	Penicillin-Streptomycin Solution, stabilized	1 ml
Fibroblast Growth Medium (11% FCS) Lagerung bei 2 - 8°C	Fibroblast Growth Medium	500 ml
	Fetal Calf Serum (FCS)	55 ml
	Supplement für Fibroblast Growth Medium	10 ml
	Penicillin-Streptomycin Solution, stabilized	1 ml
FIX-II-Lösung	Ampuwa	912 ml

Lagerung bei 2 - 8°C	Glutaraldehyd 25%	86 ml
	HCl (1 N)	1,5 ml
	Natrium-Cacodylat Trihydrat	11,3 g
Immunfluoreszenz-Antikörperlösung	1:200 in PBS mit	
	Fetal Calf Serum (FCS)	15 ml (10%)
	Bovines Serumalbumin (BSA)	6 g (4%)
Medium199 Earle's (gebrauchsfertig) Lagerung bei 2 - 8°C	Medium199 Earle's	500 ml
	Penicillin-Streptomycin Solution, stabilized	1 ml
Propidiumjodid (PI) (cPI = 25 mM) Lagerung bei -20°C	Propidiumjodid (PI)	25 mg
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	1496 µl
„Spüllösung“ Lagerung bei -20°C	Medium199 Earle's	494 ml
	Gentamycin 10 mg/ml	5 ml
	Heparin, 5.000 I.E./0,2 ml	1 ml
„Stopplösung“ Lagerung -20°C	Medium199 Earle's	500 ml
	Fetal Calf Serum (FCS) 20%	125 ml
Sudanschwarz	Sudanschwarz 0,3% in	
	Ethanol 70%	
Trypsin-EDTA 1:20 Lagerung bei -20°C	Phosphate Buffered Saline (PBS)	475 ml
	Trypsin-EDTA solution (10x)	25 ml

**OP-Besteck**

Artikel	Hersteller
Bull-Dog-Klemme	Aesculap AG, Tuttlingen, GER
Klemme, steril	
Nadelhalter	
Nierenschale, steril	
Pinzette, groß, steril	
Schere, steril	

**Verbrauchsartikel und andere Materialien**

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
Abdecktuch Secu-Drape, steril, 45 x 75 cm	Sengewald, Clinic Innovation, Rohrdorf-Thansau, GER	504572
Becher mit Deckel, steril, 500 ml	Nalgene, Rochester, NY 14625, USA	
Becher unsteril, 500 ml	DWK Life Sciences GmbH, Mainz, GER	
Becherglas mit Filterdeckel, steril, 500 ml	DWK Life Sciences GmbH, Mainz, GER	
Bottle Top Filter 0,22 µm	Nalgene, Rochester, NY 14625, USA	5954520
Bottle Top Filter 0,45 µm	Nalgene, Rochester, NY 14625, USA	2954545

Chirurgischer Nähfaden, Supolene grün	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, GER	91513
Combi Stopper (rot)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	4495101
Cryo Tube vials	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER	375418
Deckglas 25 mm aus Kunststoff	Fa. Sarstedt, Newton, USA	83.1840
Deckgläser 24 x 24 mm	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER	H875.1
Deckgläser Immunhistochemie	Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, GER	BBAD02200-600#A
Dreiwegehahn Discifix C-3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	16494C
Einbettkassetten (Rotilabo)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	K113.1
Filter Minisart 0,22 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, GER	16534
Flaschen, steril, 500 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA	8393
Gefäß-/Kanülrier-Kanülen	Medtronic GmbH, Meerbusch	30004
Handschuhe, steril	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, GER	9021
High-Vacuum Grease Silicone	Dow Corning Corporation, MI, USA	3826-50
Kanülen: BD Microlance	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	301300
Latexhandschuhe Vasco Basic: S, M, L	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	6066616, 6066624, 6066632
Millex-GS Spritzenfilter 0,2 µl, steril	Millipore Corporation, MA, USA	SLGS033SS
Neolus Luer Needles	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium	NN-2070S
Paraffin 50 - 52°C	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	CN48.2
Petrischale, 47 mm	Millipore Corporation, MA, USA	PD 1004700
Petrischalen aus Polystyren, 100 mm Durchmesser	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER	4021
Pipetboy	Fa. Integra, Fernwald, GER	155000 155 018
Pipetboy	Eppendorf AG, Hamburg, GER	
Pipette 100 - 1.000 µl, 20 - 200 µl, 0,1 - 3 µl	Eppendorf AG, Hamburg, GER; Biohit, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, GER	
Pipettenspitzen 10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	701.116.210
Pipettenspitzen 100 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	70.760.212
Pipettenspitzen 1250 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	701.186.210
Polyurethan-Scaffold	ITV, Denkendorf, GER	
Probenhalter REM	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER	10-003012
Röhrchen, 1,5 ml, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, GER	0030120086
Röhrchen, 15 ml mit Schraubdeckel, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	62.554.002



Röhrchen, 50 ml mit Schraubdeckel, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	62.559.001
Serologische Pipetten: 1 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA	4485
Serologische Pipetten: 10 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA	4488
Serologische Pipetten: 2 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA	4486
Serologische Pipetten: 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, GER	760180
Serologische Pipetten: 5 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA	4487
Serologische Pipetten: 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, GER	768180
Skalpell Nr. 23	Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, JPN	02.001.30.020
Spritze, 10 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	309110
Spritze, 2 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	300928
Spritze, 20 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	300296
Sterile Pipettenspitzen 100 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	70.760.212
Teflonring und -stäbe	Laborwerkstätten des Klinikums Großhadern	
Transferpipetten 3 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	86.1171
Well-Platten (12-Well)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	353043
Zählkammer: Neubauer improved C-Chip, disposable Hemocytometer	Digital Bio, Korea über Biochrom AG, Berlin, GER	CHC-N01
Zellkulturflasche 12,5 cm <sup>2</sup> BD Falcon	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	353104
Zellkulturflaschen 12,5 cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	353107
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, NY, USA	3151
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, NY, USA	430641

### Arbeitsgeräte

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
Analysenwaage ABS 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, GER	
Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030	Bal-Tec GmbH, Witten, GER	L-701431
Bal-Tec Sputter Coater SCD 050	Bal-Tec GmbH, Witten, GER	L-106975

Besiedelungsbioreaktor	Laborwerkstätten des Klinikums Großhadern	
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER	
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, GER	G-719311
Gefrierschrank, -20°C, "Comfort Plus"	Siemens, München, GER	G-259078
Inkubator APT line TM CB	Binder GmbH, Tuttlingen, GER	
Konditionierungsbioreaktor	Laborwerkstätten des Klinikums Großhadern	
Kühlschrank	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, GER	"Glass Line"
Kühlschrank "Sikafrost"	Siemens, München, GER	G-259082
Laminar Airflow „Hera Safe“	Kendro Laboratory Products, Hanau, GER	
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, GER	
Mikroskop "Axiovert 35"	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER	
Mikroskop "Leica DMR"	Leica GmbH, Wetzlar, GER	
Mikroskop Bildverwaltungssystem	Leica GmbH, Wetzlar, GER	Leica Image Manager 50
Mikroskop Farbkamera	Leica GmbH, Wetzlar, GER	Leica DC200
Mikrotom mit Fast freezing Unit KS 34	Microm International GmbH (part of Thermo Fisher Scientific), Walldorf, GER	HM 430 mit KS 34
PC Celsius	Fujitsu Technology Solutions GmbH, Augsburg, GER	
BioPhotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg, GER	
pH-Meter WTW Inolab Level 1	WTW, Weilheim, GER	
Rasterelektronenmikroskop Zeiss evo LS10	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER	
Rotor Holder	Qiagen GmbH, Hilden, GER	9018908
Rotor-Disc 100 Loading Block	Qiagen GmbH, Hilden, GER	9018909
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Qiagen GmbH, Hilden, GER	9018896
Rotor-Disc 100 Rotor	Qiagen GmbH, Hilden, GER	9018895
Rotor-Disc Heat Sealer 230 V	Qiagen GmbH, Hilden, GER	9019725
Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH, Hilden, GER	
Stickstoffbehälter	Messer Griesheim	
Wärmebad „Julabo SW 23“	Kendro Laboratory Products, Hanau, GER	
Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, GER	WTC
Wasserbad (Paraffinstreckbad)	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, GER	25900
Zentrifuge „Rotina 46 R“	Hettich, Tuttlingen, GER	

## 10.4 Einverständniserklärung für Patienten zur Zellspende



### Patienteneinverständniserklärung zur Spende von Biomaterial für die herzchirurgische Forschung

Dr. med. Nikolaus Thierfelder  
Leiter medizinische Forschung der  
AG „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“

Telefon +49 (0)89 4400-74791  
Telefax +49 (0)89 4400-78671  
Email: Nikolaus.Thierfelder@med.uni-muenchen.de  
<http://hch.klinikum.uni-muenchen.de>

Postanschrift:  
Marchioninistr. 15  
81377 München

Sehr geehrter Patient,

die Forschungsgruppe „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“ der herzchirurgischen Klinik versucht neuartige, individualisierte Therapiekonzepte für die Zukunft zu entwickeln und zu etablieren. Hierfür sind wir auf die Verwendung von gespendetem Gewebe, insbesondere Zellen, angewiesen. Es ist möglich, dass im Rahmen ihrer Bypass-Operation nicht verwertbare Reststücke von Gefäßen anfallen. Wir würden sie bitten, dieses Gewebe für Forschungszwecke freizugeben.

Ich, ....., geboren am, ....., wurde von meinem Arzt um die Spende von Biomaterial gebeten. Ich hatte die Möglichkeit Fragen zu stellen und habe die Antworten verstanden.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich für die Spende der übrig bleibenden/gebliebenen Gefäßstücke aus meiner Operation frei zu entscheiden und weiß, dass die Verwendung nur zu medizinischen Forschungszwecken dient.

Darüber hinaus bin ich darüber informiert worden, dass mir aus einer Verweigerung meines Einverständnisses keinerlei Nachteile erwachsen. Ich bin darüber informiert worden, dass mein Gewebe nur in vollständig anonymisierter Form verwendet wird. Im Falle eines Widerrufs dieser Einwilligung ist eine Vernichtung der Proben deshalb nicht möglich.

Ich erkläre hiermit mein freiwilliges Einverständnis zur Verwendung der übrig bleibenden/gebliebenen Gefäßstücke aus meiner Operation.

Eine Kopie der Einverständniserklärung habe ich erhalten.

München, den .....

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Patienten

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des aufklärenden Arztes

Für ihre Unterstützung der Wissenschaft möchten wir uns im Namen unserer Forschungsabteilung bei Ihnen bedanken!

Dr. med. Nikolaus Thierfelder

Prof. Dr. med. Christian Hagl (Klinikdirektor)

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik:  
öffentl. Verkehr:

Prof. Dr. med. Christian Hagl  
U6, 56, 266, 269 oder N41 bis Haltestelle Klinikum Großhadern

## 10.5 Vorversuch: Zellquantifizierung zur Besiedelung

Die zur Besiedelung benötigte Zellzahl pro  $\text{cm}^2$  PU-Material, welche eine Konfluenz unter Erhalt der Zellvitalität gewährleistet, konnte in diesem Vorversuch ermittelt werden. Angenommen wurde eine ausreichende Konfluenz bei 750.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  PU-Material, sodass diese Anzahl 100% entsprachen. Absteigende Konzentrationen betragen 80%, 60%, 40% und 20% von 750.000 Zellen. Damit konnte auch die minimale Zellkonzentration bestimmt werden, welche für eine Konfluenz bei gleichzeitiger Zellvitalität benötigt wird.

Für diesen Versuch wurden PU-Patches mit der jeweiligen Zellkonzentration besiedelt. Nach der Isolation und Kultivierung in Zellkulturflaschen konnten die Zellen auf die in 12-Well-Platten platzierten PU-Patches gegeben werden. Die Zellkonzentration betrug pro  $\text{cm}^2$  PU-Patch jeweils 750.000 Zellen (100%), 600.000 Zellen (80%), 450.000 Zellen (60%), 300.000 Zellen (40%) und 150.000 Zellen (20%). FB ( $n = 5$ ) und EC ( $n = 5$ ) wurden dabei getrennt beobachtet. Nach Zugabe von Zellmedium erfolgte eine Ruhephase von 24 Stunden mit anschließender Evaluation über die DAPI-Zellkern- sowie LD-Färbungen.

Bei FB-besiedelten Patches ist ab einer Zellkonzentration von 300.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  (*siehe Abb. 10.1*), bei EC-besiedelten Patches ist ab 450.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  (*siehe Abb. 10.2*) mit einer konfluenten Zellschicht zu rechnen. Die Zellen sind überwiegend vital und gleichmäßig auf dem Patch verteilt. Beim Hauptversuch konnten nach 24 Stunden Besiedelung Zellkonzentrationen von durchschnittlich über 90% erreicht werden. REM- sowie IF-Aufnahmen lassen darauf schließen, dass eine Konfluenz sowie Zellvitalität bei den durchgeführten Versuchen vorlag.

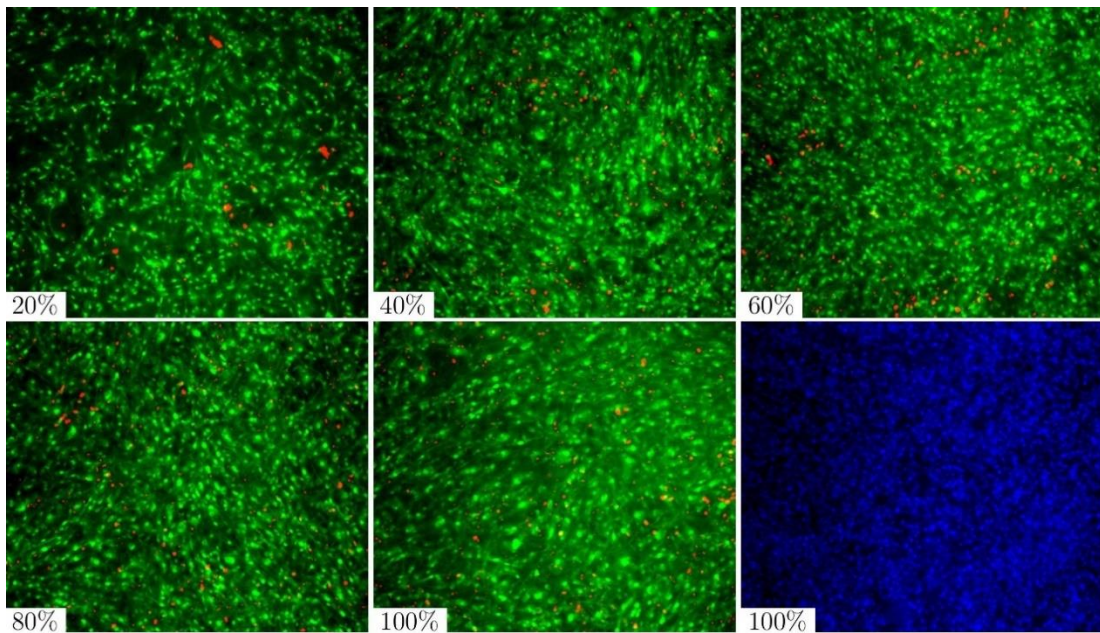


Abbildung 10.1: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FB-besiedelten PU-Patches.

LD-Färbung (vitale Zellen grün, tote Zellen rot) sowie DAPI (DNA-Marker, blau). Angabe der prozentualen Zellkonzentration. Exemplarisch ist eine DAPI-DNA-Färbung dargestellt, welche für jede Konzentration durchgeführt wurde. Es bestehen überwiegend vitale Zellen bei allen Konzentrationen. Ab einer Konzentration von  $> 40\%$  ist von einer Konfluenz auszugehen.

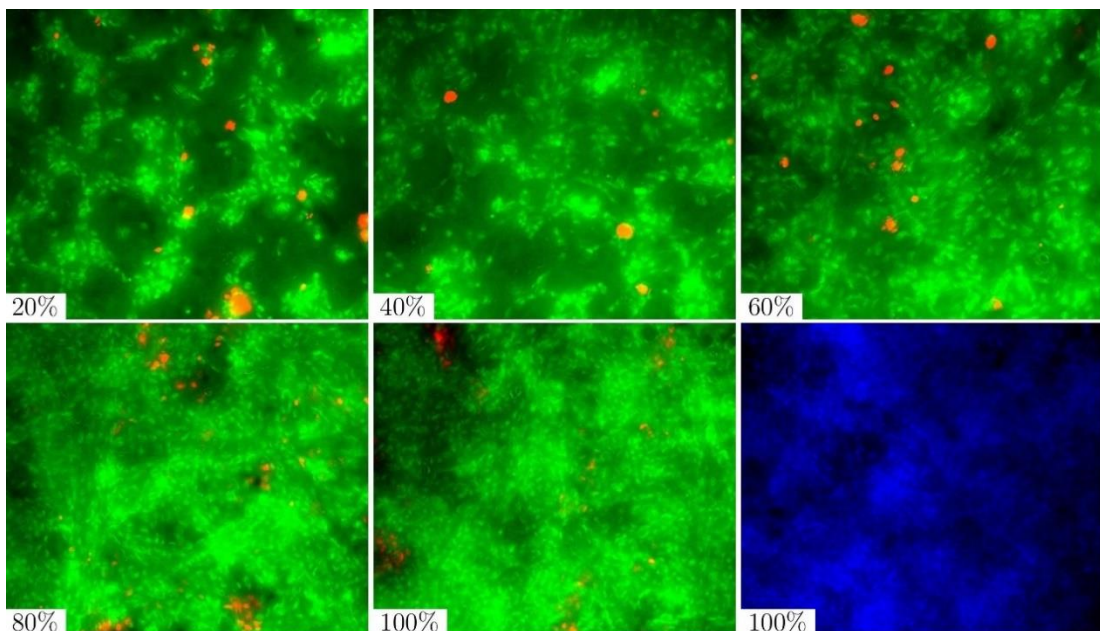


Abbildung 10.2: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EC-besiedelten PU-Patches.

LD-Färbung (vitale Zellen grün, tote Zellen rot) sowie DAPI (DNA-Marker, blau). Angabe der prozentualen Zellkonzentration. Exemplarisch ist eine DAPI-Zellkern-Färbung dargestellt, welche für jede Konzentration durchgeführt wurde. Die Zellen sind überwiegend vital bei allen Konzentrationen. Ab einer Konzentration von  $> 60\%$  ist von einer Konfluenz auszugehen.



## 10.6 Gassterilisation des PU-Materials

In einem Vorversuch konnte eine mögliche Auswirkung der Gassterilisation auf die Struktur des PU-Materials ausgeschlossen werden. Es erfolgte der Vergleich von PU-Material, welches zuvor gassterilisiert wurde mit nicht-gassterilisiertem PU-Material. Hierfür konnten PU-Material-Stücke ( $n = 20$ ) unterschiedlicher Stärke und Festigkeit verwendet werden. Dabei variierte die Dicke des Materials zwischen 0,639 - 2,080 mm. Es erfolgte eine Einteilung in fünf verschiedene Dicke- bzw. Stärkegrade, um mögliche Unterschiede aufgrund der Stärke des Materials auszuschließen. Die gassterilisierten Proben konnten in ihrer Morphologie mittels REM mit den nicht-gassterilisierten, unbehandelten Proben verglichen werden. Der Vergleich einer nicht-gassterilisierten (A) mit einer gassterilisierten (B) Probe ergibt, dass eine Gassterilisation keine Auswirkung auf die PU-Struktur hat (*siehe Abb. 10.3*). Es zeigen sich die typischen PU-Fasern, welche an vereinzelt Stellen produktions technisch bedingt angehäuft sind. Veränderungen in der PU-Struktur sind in beiden und besonders in der gassterilisierten Probe nicht zu beobachten.

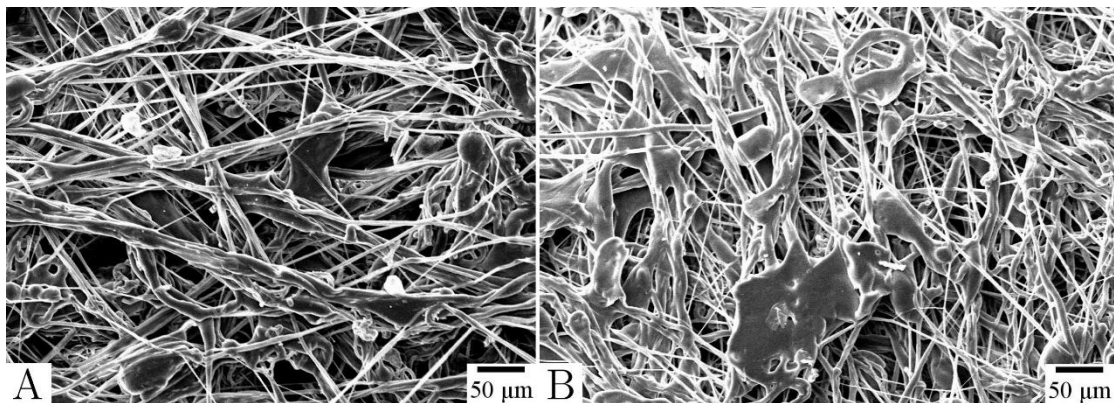


Abbildung 10.3: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von nicht-gassterilisiertem (A) und gassterilisiertem (B) PU-Material.

Dicke der Proben: A: 0,694 mm und B: 1,500 mm. Es ergibt sich kein Unterschied aufgrund von Gassterilisation. Die typische faserige Struktur mit einer teilweisen, produktionsbedingten Anhäufung der Fasern ist in beiden Proben zu sehen und spricht für keine Veränderung der PU-Struktur aufgrund der Sterilisation.

## 10.7 Zellauszählungen nach Besiedelung

Nach dem 24 Stunden-Besiedelungsvorgang wurden die verbliebenen Zellen, welche sich nicht an das PU angelagert haben, im Zellmedium ausgezählt (*siehe Tabelle 10.1*). Der Durchschnittswert aller im Medium verbliebenen Zellen wurde für jeden Hauptversuch ermittelt (FB:  $3,21 \pm 1,69$  Millionen; EC:  $6,69 \pm 3,46$  Millionen). Die Durchschnittswerte aller Hauptversuche wurden ins Verhältnis zur gesamten Zellanzahl von 46.652.652 Zellen pro Besiedelung gesetzt. Insgesamt lagerten sich 7% der FB nach FB-Besiedelung und 14% der EC nach EC-Besiedelung nicht an das PU an. Diesen Berechnungen folgend haben sich durchschnittlich 93% der FB und 86% der EC an das PU angelagert. Es lagerten sich durchschnittlich  $43,44 \pm 1,69$  Millionen FB und  $40,00 \pm 3,46$  Millionen EC nach den jeweiligen Besiedelungsvorgängen an das PU an.

	Zellen nicht an PU angelagert	Anteil	Zellen an PU angelagert	Anteil
<b>24h FB-Besiedelung</b>	$3,21 \pm 1,69$ Millionen	7%	$43,44 \pm 1,69$ Millionen	93%
<b>24h EC-Besiedelung</b>	$6,69 \pm 3,46$ Millionen	14%	$40,00 \pm 3,46$ Millionen	86%

*Tabelle 10.1: Zellauszählungen nach Besiedelung.*

*Angegeben sind die durchschnittlichen Zellauszählungen jeweils nach FB- und EC-Besiedelung (Angaben in Millionen). Diese Durchschnittswerte wurden in Verhältnis zur gesamten Zellanzahl pro Besiedelungsvorgang gesetzt (Angaben in Prozent).*

## 10.8 Gelelektrophorese zur Bestimmung der RNA-Integrität

Die RNA-Integrität konnte mittels Gelelektrophorese bestimmt werden (*siehe Abb. 10.4*). Dabei wurden die insgesamt 45 Proben gegen einen Normwerte verglichen. Intakte RNA stellt sich durch zwei getrennte Banden in der Elektrophorese dar.

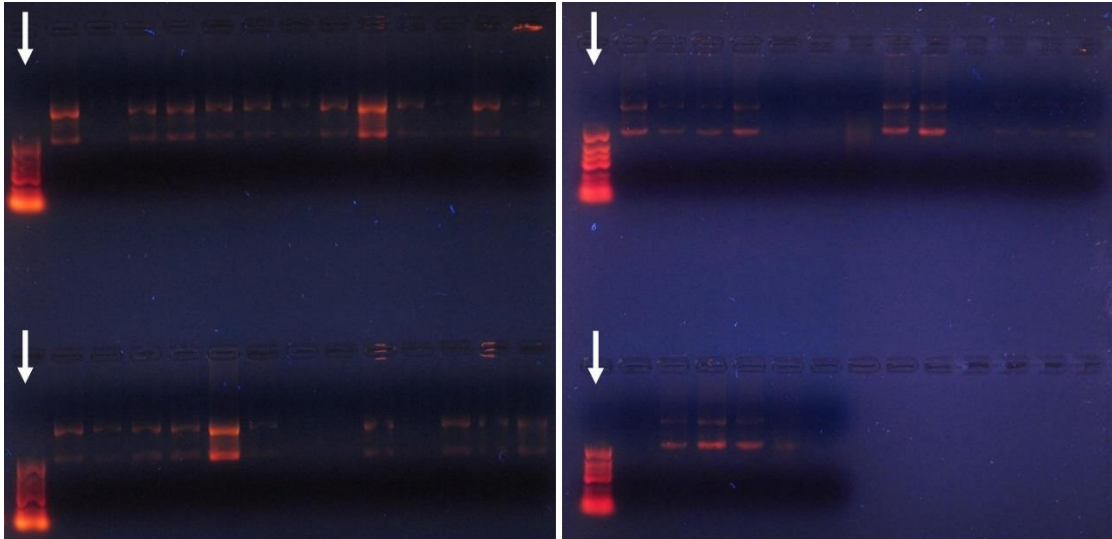


Abbildung 10.4: Gelelektrophorese der RNA-Proben.

Die mit Pfeilen markierten Banden stellen Standard-Fragmente dar und dienen der Einschätzung der Länge der RNA-Fragmente.



---

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl bedanken, der mir die Möglichkeit gab meine Promotion an seinem Institut der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu dürfen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Dipl.-Ing. Fabian König für die wertvolle Unterstützung und außerordentlich kompetente fachliche Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Durch die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe war es mir erst möglich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen und Einblicke in die Forschung des kardiovaskulären Tissue Engineerings zu erhalten. Durch ihre hilfreichen Ratschläge während des Entwicklungsfortschritts der Arbeit und der Korrektur konnten beide mich durch ihre große Erfahrung unterstützen. Hierfür gilt mein aufrichtiger Dank. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn M. Sc. Maximilian Grab für den konstruktiven Beitrag zur Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei Laborabläufen möchte ich mich sehr herzlich bei den technischen Assistentinnen Frau Eike Petersen, Frau Ulrike Haas sowie Frau Barbara Steinl bedanken, die mir durch ihre Erfahrung und ihr Wissen eine besondere Hilfe waren. Für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der Erarbeitung und Durchführung der Methoden sowie im Umgang mit Zellkulturen bedanke ich mich sehr.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung am Klinikum der Universität München, die mich tatkräftig bei der Paraffineinbettung unterstützt haben sowie die Verwendung der hierfür notwendigen Geräte und Materialien ermöglichten.

Bei der Laborwerkstatt und der Zentralsterilisation des Klinikums möchte ich mich für deren Unterstützung bedanken. Durch sie wurde die Verwendung des Bioreaktors erst möglich.

Ein außerordentlicher und herzlicher Dank gebührt meiner Familie. Ohne deren stetige Unterstützung, Motivation, allzeitigen Rückhalt und konstruktive Kritik wäre nicht nur diese Arbeit, sondern mein Medizinstudium nicht möglich gewesen.

## 12 Eidesstattliche Versicherung

Witzel, Katja

---

Name, Vorname

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

*In-vitro* Tissue Engineering von zellbesiedelten Polyurethan-Scaffolds: Bildung von extrazellulärer Matrix unter Einfluss von endothelialer Beschichtung und pulsatilem Fluss

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.

Stuttgart, den 18.02.2020

Katja Witzel

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

