

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE
PROFESSOR DR. C. SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Biochemische Charakterisierung von mikrokristalliner Zellulose und
Besiedelung mit Endothelzellen.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
FRANZ HILBER

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE
PROFESSOR DR. C. SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Biochemische Charakterisierung von mikrokristalliner Zellulose und
Besiedelung mit Endothelzellen.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
FRANZ HILBER

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christof Schmid
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Maier
Tag der mündlichen Prüfung:	20.05.2015

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsangabe

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Erklärungen zur Mikrokristallinen Zellulose und zur artifiziellen Gefäßsubstitution	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Zellkultur	4
2.1.1 Regeln für steriles Arbeiten in der Zellkultur	4
2.1.2 Isolierung von vaskulären Zellen	4
2.1.2.1 Isolierung von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)	4
2.1.2.2 Isolierung von Glattmuskelzellen (SMC) aus humanen Blutgefäßen	5
2.1.3 Weitere Schritte und Maßnahmen	6
2.1.3.1 Kultivierung der HUVEC	6
2.1.3.2 Kultivierung der SMC	7
2.1.3.3 Zellzählung	7
2.1.3.4 Einführung einer Codierung zur Identifikation	7
2.1.3.5 Förderung der Zelladhäsion	7
2.2 Mikrokristalline Zellulose	8
2.2.1 Eingesetzte MC	8
2.3 Bestimmung von Vitalität und Stoffwechselaktivität in Zellkulturen	9
2.3.1 MTS-Färbungen zur Proliferationsbestimmung	9

2.3.2	Multitox-Färbung	9
2.3.3	Histologische und immunhistologische Färbungen	10
2.3.3.1	Anfertigung der Präparate	10
2.3.3.2	CD31 von der Maus, vWF vom Kaninchen	11
2.3.3.3	Ki 67 von der Maus	12
2.3.3.4	Glattmuskel- α -Aktin (SMA) aus der Maus	12
2.3.3.5	Collagen I + III, Elastin	12
2.3.4	DAPI-Färbung	13
2.3.5	HE-Färbung	13
2.4	Besiedelung von schlauchförmiger MC mit Endothelzellen aus humanen Umbilicalvenen (HUVEC)	14
2.4.1	Zellkultivierung	14
2.4.2	Die Perfusionsanlage	14
2.4.3	Das Vorgehen bei der Besiedelung	15
2.5	Verwendete Materialien, Arbeitsschritte	16
3. Ergebnisse		20
3.1	Besiedelung der mikrokristallinen Zellulose mit vaskulären Zellen	20
3.1.1	Besiedelung der MC mit Glattmuskelzellen durch Beschleunigung	20
3.1.2	Besiedelung der MC mit Glattmuskelzellen und Endothelzellen	23
3.1.3	Besiedelung der MC mit Endothelzellen	31
3.2	Besiedelung von schlauchförmiger MC in der Perfusionsanlage	35
3.2.1	Äquilibrierung und Besiedelung der MC-Schläuche	35
3.2.2	Histologische Beurteilung	36

4. Diskussion	37
4.1 Ziel der Arbeit und wesentliche Ergebnisse	37
4.2 Vergleich der MC mit biologischen Prothesen und Synthetischen Polymeren	38
4.3 Gefäßersatz und Hämostase	41
4.3.1 Übersicht entscheidender Punkte	41
4.3.2 Endothelzellen und ihre Eigenschaften	42
4.4 Diskussion der eigenen Versuche	43
4.4.1 Beschleunigungsversuch	43
4.4.2 EC-Besiedelung mit/ohne Gelatine, Fibronectin und BME	44
4.4.3 SMC- / EC-Besiedelung	45
4.4.4 Perfusionsversuch	47
4.5 Verbesserungsmöglichkeiten	48
4.5.1 Thromboseprophylaxe durch Oberflächenmodifikation	48
4.5.2 Verbesserung der EC-Adhäsion durch MC-Modifikation	49
4.5.3 Verbesserung der Endothelialisierung durch Besiedelung im Perfusionsbioreaktor	51
5. Schlussbetrachtung	53
6. Literaturverzeichnis	54

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Erklärungen zur Mikrokristallinen Zellulose und zur artifiziellen Gefäßsubstitution

Der Gefäßersatz der Koronararterien ist die heutzutage am häufigsten durchgeführte herzchirurgische Operation. In den USA sind die Zahlen von einem absoluten Maximum von 519000 auf etwa 300000 Bypassoperationen pro Jahr zurückgegangen [Graziano et al 2006], in Deutschland wird bei etwa 55000 Patienten pro Jahr eine Bypassoperation durchgeführt [Wiedmann 2010]. Der Gebrauch autologen Gefäßersatzes nimmt einen nicht zu unterschätzenden Einfluss im Bereich der rekonstruktiven Gefäßchirurgie ein. Zudem sind körpereigene Arterien oder Venen teils nicht mehr verwertbar, z.B. bei diabetischen Angiopathien, oder bereits entfernt, z.B. im Rahmen eines Venenstrippings. Auch dürfen der Zeitfaktor für deren Gewinnung und die erhöhte Quote von Folgeerkrankungen in ihrer Bedeutung nicht unterschätzt werden [Verma et al. 2004].

Tissue Engineering ist ein sich rapide entwickelnder Forschungsbereich mit dem Ziel, die Funktion beschädigten Gewebes und dysfunktionaler Organe wiederherzustellen und gegebenenfalls sogar zu verbessern [Helenius et al. 2006].

Im Prinzip ist ein Blutgefäß ein hohler Zylinder [Wiedemann 2010]. Bereits 1912 wurden Prothesen aus Glas und Aluminium getestet. Die erste künstlich mittels Tissue Engineering hergestellte Gefäßersatzprothese wurde im Jahr 1986 von Weinberg und Bell publiziert. Sie stellten Zellkulturen aus Rinderepithel- und Glattmuskelzellen sowie Fibroblasten her, welche sie in Kollagengerüste einwachsen ließen, die durch ein Dacron[®]-Geflecht unterstützt wurden.

Heutzutage finden Biomaterialien wie Polytetrafluorethylen (ePTFE) und der Polyethylenterephthalat-Faden (Dacron[®]) in der rekonstruktiven Gefäßchirurgie in Fällen Verwendung, in denen körpereigene Gefäße nicht mehr vorhanden oder unbrauchbar sind. Sie stellen mittlerweile eine sinnvolle Alternative zur körpereigenen Gefäßsubstitution dar [Deutsch et al. 1999].

Allerdings sind diese Materialien nur begrenzt einsetzbar, denn während sie sich für den Ersatz großlumiger, peripherer Gefäße absolut eignen, sind die Eigenschaften und daraus resultierenden Ergebnisse für kleinere Gefäße, wie z.B. Koronararterien, äußerst dürftig. Hier kommt es zu verfrühter Thrombosierung, was zur Folge hat, dass viele Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) unbehandelt bleiben [Greene et al. 2001]. Um Thrombosierung zu vermeiden, sollten Materialien, die mit Blut in Kontakt treten, antithrombogene Eigenschaften aufweisen.

Das interaktive Gefäßendothel des Menschen zeigt im funktionalen und adaptiven Bereich außerordentliche Eigenschaften, wie z.B. die Regulation

der Koagulation oder der Fibrinolyse, die Initiation und Modulation inflammatorischer Prozesse oder auch die Kontrolle des Gefäßtonus und des Blutstromes [Fink et al. 2010].

Die wichtigste Eigenschaft eines intakten Endothels ist die Erschaffung und Aufrechterhaltung einer glatten, athrombogenen Oberfläche. Um ein Interface zwischen Blut und synthetischem Trägermaterial zu generieren, bietet sich die Besiedelung mit Endothelzellen auf der Innenseite des künstlichen Gefäßes an. Ebenso sollte das Material Endothelzellen zur Absiedelung stimulieren. Ohne Endothelzellschicht, also eine kontinuierliche selektiv permeable und athrombogene Barriere zwischen Blut und Gefäßwand, fehlt ein entscheidender Regulationsmechanismus, der eine zentrale Rolle spielt, allein ein Blick auf die Virchowsche Trias zeigt es [Levick 2003]. Weiterhin kontrolliert das Endothel Thrombozytenfunktion [Autio et al. 1989], Leukozytenadhäsion [Cybulsky et al. 1991] und verschiedene Bereiche der Glattmuskelzellfunktion [Casscells 1992].

Das Bakterium *Acetobacter Xylinum* produziert unter Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle (Schramm-Hestrin-Medium) [Wippermann et al. 2009] ein Polysaccharid, welches interessante Möglichkeiten im Bereich des Gefäßersatzes auf der Tissue-Engineering-Ebene bietet [Zahedmanesh et al. 2011]. Dieses Polysaccharid wird „Mikokristalline Zellulose“ (MC), im englischen Sprachgebrauch auch „Bacterial Cellulose“ genannt. In den Bereichen Berstdruck, Wasseranteil sowie Faserbeschaffenheit ist die MC dem Kollagen ähnlich [Backdahl et al. 2006]. Als weitere bemerkenswerte Eigenschaften können die extrem klare Reinheit und die Netzwerkstruktur im Nanofibrillenbereich genannt werden [Lee et al. 2001]. Darüberhinaus ist MC absolut biokompatibel, wie in-vivo-Versuche zeigten. Alle genannten Eigenschaften sprechen für MC als idealen Gefäßersatz. Allerdings weist MC eine schlechte Zelladhäsionsfähigkeit aus. Aus diesem Grund muss die MC modifiziert werden, was im weiteren Verlauf der Arbeit beschrieben werden soll.

MC wurde auch bereits als Endoprothetikmaterial im Bereich Gefäßchirurgie und bei temporären Hauttransplantationsplastiken in der plastischen Chirurgie eingesetzt [Fontana et al. 1990]. Ebenso wurde das Material als Trägergerüst für das Tissue Engineering des Knorpels eingeführt [Svensson et al. 2005]. Zudem zeigt sich der Einsatz von MC äußerst vielversprechend, wenn es um Wiederherstellung und Ersatz im Bereich des zentralen Nervensystems geht, welches aufgrund degenerativer Prozesse beschädigt sein kann [Fink et al. 2010].

Statisches Besiedeln, bei dem sich eine konzentrierte Zellsuspension in passiver Weise auf ein Gewebe absetzen soll, ist die am meisten verwendete Zellbesiedelungstechnik des Tissue Engineering. Dieses Verfahren bietet jedoch leider nur ein mittelmäßiges Besiedelungsergebnis und eine minimale Eindringtiefe ins Gewebe [Roh et al. 2007]. Um die Defizite des statischen Besiedelns zu überwinden, wurden andere Vorgehensweisen entwickelt, z.B. dynamische [Nasserri et al. 2003, Kim et al. 1998] und magnetische Verfahren [Ito et al. 2005], Vakuumtechniken

[Solchaga et al. 2006], elektrostatisches Besiedeln [Field et al. 2003] und Besiedeln per Zentrifuge [Godbey et al. 2004]. Die Zentrifugentechnik hat sich zu einem neuartigen Verfahren im Tissue Engineering entwickelt, um die Absiedelung in porösen, biologisch abbaubaren Gewebegerüsten zu verbessern [Roh et al. 2007]. Andere Verfahren, die eine hohe Biokompatibilität erreichen, verwenden als Trägergerüst denudierte menschliche Nabelschnurvenen (HUV) und erreichen eine Neubesiedelung mittels einer Perfusionsanlage [Hönicka et al. 2010].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die wichtigsten der genannten Techniken auf die Besiedelung von Schläuchen aus Mikrokristalliner Zellulose mit Endothelzellen anzuwenden. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sollen miteinander verglichen und Vorteile sowie Defizite der verschiedenen Herangehensweisen eingehend dokumentiert werden. Als Hauptziel wurde die Etablierung eines strömungsresistenten und vitalen Endothels ausgerufen. Hierbei kamen neben dem klassischen Verfahren, dem statischen Besiedelung einer Oberfläche, zwei weitere nichtstatische Techniken zur Zellkultivierung zur Anwendung, einerseits die Zentrifugation, andererseits die Besiedelung mithilfe einer Perfusionsanlage. In einem weiteren Schritt wurde die Installation eines Feeder Layers aus Glattmuskelzellen untersucht.

Aufgrund der Erkenntnisse Rohs et al. 2007 bietet sich die zentrifugengestützte Besiedelung der MC mit vaskulären Zellen, in diesem Fall Glattmuskelzellen (SMC) an, die in das Material eindringen und im besten Fall Extrazelluläre Matrix (EZM) produzieren sollten. Bei erfolgreicher Kultivierung käme dies dem Querschnitt einer humanen Gefäßwand im Aufbau sehr nahe. Hönicka et al. publizierten 2010 die erfolgreiche Neubesiedelung einer denudierten Nabelschnurvene mit vaskulären Zellen, in diesem Fall Endothelzellen einer menschlichen Nabelschnur (HUVEC). Dieser Erfolg war ausschlaggebend für ein weiteres, in dieser Arbeit vorzustellendes Experiment, die MC-Schläuche mit derselben Technik zu besiedeln und so ein solides Endothelzellmonolayer zu erreichen. Der dritte Versuchsaufbau bezieht sich auf die statische Besiedelung der MC mit vaskulären Zellen, die Bäckdahl et al. 2006 und Fink et al. 2010 beschreiben. Folglich soll die für diese Arbeit zur Verfügung gestellte MC mit Endothelzellen und einer Kombination von Endothelzellen auf einer SMC-Unterlage kultiviert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Regeln für steriles Arbeiten in der Zellkultur

Zur Vermeidung der Kontamination, z.B. mit Hautflora oder aerogenen Keimen, wurde folgendermaßen gearbeitet:

³⁵₁₇ Die Arbeiten am Material wurden ausschließlich mit sauberem Kittel im Zellkulturlabor durchgeführt.

³⁵₁₇ Stets wurden Einmalhandschuhe getragen, die vor Arbeitsbeginn unter der Sterilbank mit Ethanol (EtOH) (70%) wischdesinfiziert wurden.

³⁵₁₇ Jeder Arbeitsschritt wurde unter dieser Sterilbank ausgeführt, welche vor und nach der Benutzung mit EtOH (70%) wischdesinfiziert wurde.

³⁵₁₇ Es wurden ausschließlich sterile Gefäße und Materialien verwendet.

³⁵₁₇ Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Kulturgefäße waren mit gaspermeablen Verschlüssen versehen.

2.1.2 Isolierung von vaskulären Zellen

2.1.2.1 Isolierung von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)

Die Nabelschnüre, welche sowohl vom Regensburger Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Klinik St. Hedwig, als auch von der Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt worden waren [Hoenicka et al. 2011], wurden unverzüglich für die enzymatische Zellgewinnung verwendet [Jaffe et al. 1973]. Die Ischämiezeit betrug maximal 40 Stunden, da in diesem Zeitraum kein Funktionsverlust der Nabelschnurvenen festgestellt werden konnte [Hoenicka et al. 2008]. Für die Sammlung von Nabelschnurgefäßen bestand ein Ethikvotum (03/184) der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg. Zur Versorgung der Nabelschnüre wurden sterile 250ml-Schraubdeckelgefäße, gefüllt mit 100ml eines Nährmediums, an die Geburtskliniken geliefert.

Die unter der Sterilbank ausgeführte Präparation begann nach Ausbreiten eines sterilen Abdecktuches mit der ersten Reinigung der Nabelschnur in 70%igem EtOH; für 30 Sekunden wurde die Nabelschnur darin mit Hilfe einer sterilen Pinzette geschwenkt. Daraufhin wurde sie in „phosphate-buffered-saline“ (PBS) überführt, um somit Alkohol und die letzten Blutreste abzuwaschen. In fast allen Fällen wurde vorher von beiden Enden der Nabelschnur ca. ein Zentimeter mithilfe eines Skalpells abgenommen, um die Gefäße besser zur Darstellung bringen zu können. Hierauf wurde die Nabelschnurvene, die am größeren Gefäßdurchmesser und der dünneren Gefäßwand eindeutig von den Nabelschnurarterien

abgrenzbar ist, nacheinander von beiden Seiten aus mit PBS durchgespült, um eventuell vorhandene Koagel und Restblut aus dem Lumen zu entfernen. Hierfür wurde eine Venenverweilkanüle der Größe 18G verwendet. Danach wurde mit einer Gefäßklemme ein Ende der Nabelschnur verschlossen, die Vene mit Kollagenase prall aufgefüllt und daraufhin das andere Ende der Nabelschnur ebenfalls mit einer Gefäßklemme verschlossen. Es folgte eine 30minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C im steril verschlossenen Becherglas. Nach dieser Zeit wurde die Nabelschnur an einem Ende mit einer chirurgischen Schere aufgeschnitten und die Kollagenaselösung mit den darin befindlichen HUVEC in ein Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurde die Nabelschnurvene von beiden Enden aus mit jeweils 10 ml PBS durchgespült, um nachträglich eventuell verbliebene Reste zu gewinnen. Das Röhrchen wurde im Anschluss vier Minuten bei 301g (entspricht 1200 Umdrehungen/Minute) und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss aspiriert, das Pellet mit Nährmedium versehen und anschließend in der Passage 0 auf ein T75-Kulturgefäß ausgesät. Die T75-Flaschen mussten bei EC-Kulturen gelatiniert werden (Gelatine-Lösung 0,25%, 30 Minuten bei 37°C inkubiert). Das in allen Experimenten verwendete Nährmedium M199 enthielt D-Glukose (1g/l), da humane Zellen in Kultur immer auf externe Energieträger angewiesen sind und die intrazellulären Glykogenspeicher nicht lange reichen.

2.1.2.2 Isolierung von Glattmuskelzellen (SMC) aus humanen Blutgefäßen

Die Kultivierung der SMC erfolgte neben Gefäßresten der A. thoracica interna auch aus Teilen der A. radialis, der Aorta oder der A. pulmonalis. Hierfür bestand ein Ethikvotum (04/126) der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg. Die Überreste dieser Gefäße wurden für die Operation nicht mehr benötigt, im OP in sterile Röhrchen gefüllt und somit dankenswerterweise für die Forschung bereitgestellt. Der Ablauf der Kultivierung, die vollständig unter der Sterilbank stattfand, soll im Folgenden genau dargestellt werden.

Im ersten Schritt wurde das Gefäßmaterial in PBS gewaschen. Daraufhin wurde möglichst sämtliches Bindegewebe von der äußeren Gefäßwand abgezogen oder abgeschnitten, ohne die Externa zu beschädigen. Hierauf wurde das Gefäß in frischem PBS gewaschen. Die Gefäße wurden mit einem Längsschnitt geöffnet, die Intima vorsichtig abgekratzt. Hierauf wurde erneut in frischem PBS gewaschen. Bei A. pulmonalis und Aorta wurde die Intima vorsichtig und oberflächlich eingeritzt, als dünnes Häutchen abgezogen und 10 Minuten in Collagenase im Wasserbad bei 37°C schüttelnd inkubiert, das restliche Gewebe wurde wieder in frisches PBS gegeben.

Die hierbei gewonnene SMC-Fraktion wurde jetzt sehr kurz gevortext, hierauf erfolgte ein Abstoppen mit Medium (Serumbestandteile inhibieren die Proteasen) und im Anschluss wurde es über einen 70µm-Zellfilter in

ein 50ml-Röhrchen gegeben. Mehrfach wurde mit Medium nachgespült, dann abzentrifugiert.

Das Pellet wurde nun resuspendiert und auf eine 6-Well-Platte gegeben (je nach Gewebegröße evtl. auch T25). Hierfür wurde als Kulturmedium SMC-Medium (Promocell) verwendet.

Mit dieser Methode konnten SMC für weitere Versuche gewonnen werden.

Das Muskelgewebe wurde in dickeren Streifen (nicht zu tief) abgezogen und in frischem PBS gewaschen, die Externa wurde verworfen.

Im Anschluss wurde das Muskelgewebe mithilfe einer neuen Skalpellklinge gestückelt, die Seitenlänge betrug maximal 1 mm. Anschließend wurden diese Stückchen in Collagenase für 3 Stunden bei 37° im Wasserbad in Röhrchen schüttelnd inkubiert.

Die Suspension wurde einmal pro Stunde gut über Kopf geschüttelt, mit SMC-Medium abgestoppt und zentrifugiert.

Das Pellet wurde danach mit SMC-Medium resuspendiert, auf T25- oder T75-Kulturflaschen ausplattiert und mit sehr wenig SMC-Medium bedeckt.

In der ersten Woche wurde nur frisches Medium zugeträufelt, danach vorsichtig abgesaugt und frisches Medium zugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte dann alle drei Tage.

2.1.3 Weitere Schritte und Maßnahmen

2.1.3.1 Kultivierung der HUVEC

Bei der Kultivierung stellte sich heraus, dass sich eine 30 minütige Behandlung der Kulturflasche mit Gelatine bei 37°C im Brutschrank vor Aussaat der HUVEC positiv auf deren Wachstum auswirkt [Marin et al. 2001]. Die HUVEC waren auf ein spezielles Nährmedium angewiesen, da sich nur so die für die Weiterverarbeitung nötige Konfluenz der Zellen erreichen ließ. Bis zur Umsetzung auf die nächst größere Kulturflasche - hierbei erhöhte sich die Passage - mussten die HUVEC regelmäßig frisches Nährmedium erhalten. Sobald der passende Zeitpunkt gekommen war, wurden die Zellen von der Oberfläche mit Trypsin-EDTA 0,05% abgelöst. Hierbei wurde der Zellrasen unter ständigem Schwenken und leichtem Beklopfen der Kulturflasche im Mikroskop beobachtet. Erfahrungswerte hatten gezeigt, dass sich nach etwa drei Minuten die HUVEC abkugelten, von der Oberfläche der Flasche lösten und frei im Medium schwammen. War die Ablösung noch nicht vollständig erfolgt, wurde die Inkubation unter Sichtkontrolle solange weiter fortgesetzt, bis sämtliche Endothelzellen abgelöst waren. Dies geschah jedoch für maximal fünf Minuten, da die HUVEC sonst enzymatisch angedaut wurden und nicht mehr verwendbar waren. Nun wurde den Zellen das doppelte Volumen an Nährmedium zugegeben; hiermit war die enzymatische Reaktion durch den Mediumzusatz „Fetales Kälberserum“ (FKS) gestoppt. Jetzt war die Überführung in die nächst größere Kulturflasche möglich, allerdings konnte auch mit der Durchführung eines Versuchs begonnen werden. Zur Aussaat einer definierten Zellzahl musste die Zellzahl durch ein Zählgerät ermittelt werden. Nach Zentrifugation der Zellsuspension mit Pelletbildung

in einem Zentrifugenröhrchen, Resuspendierung des Pellets und Überführung in ein Zählröhrchen konnte dies geschehen und wird im Gliederungspunkt 2.1.3.3. (Zellzählung) noch einmal genauer dargestellt.

2.1.3.2 Kultivierung der SMC

Die Kultivierung der SMC erfolgte nach dem exakt gleichen Schema wie die Kultivierung der HUVEC, der einzige Unterschied bestand darin, dass die Kulturflasche vor der Aussaat der SMC nicht mit Gelatine vorbehandelt und das o.g. Medium verwendet wurde.

2.1.3.3 Zellzählung

Bei der Bestimmung der Zellzahl konnte auf einen automatischen Zellzähler (CASY, Schärfe System) zurückgegriffen werden. Zunächst wurde eine im Gerät vorbestimmbare Verdünnung eingestellt. Zu einer vorgefertigten Lösung wurde dann das jeweilige Volumen der Zellsuspension gegeben und das Gerät maß daraufhin die Zellzahl pro Milliliter. Wenn man den Milliliter der Zellzahlangabe ins Verhältnis zum Volumen im Well setzte, konnte daraus zum Beispiel auf eine Zellzahl pro Well rückgerechnet werden. Die Messmethode basiert auf der Kombination des Widerstandsmessprinzips mit der Pulsflächenanalyse. Durch Ansaugen der Zellsuspension in eine Kapillare erhöht sich der Widerstand in der Kapillare, mithilfe dessen das Volumen der Zellen dargestellt wird [Kuhn 2005].

2.1.3.4 Einführung einer Codierung zur Identifikation

Jede HUVEC-Kultur wurde mit einem Code versehen, der eine zweifelsfreie Identifikation ermöglichte. Es handelte sich um eine Kombination aus einer fortlaufenden Nummer der Inventarliste des Labors, verknüpft mit der Passage der ausgewählten Kultur und dem Datum der Verarbeitung. Ein Beispiel könnte folgendermaßen aussehen:

„HUVEC 576p1, 13.12.2010“. Somit wäre „576“ die Nummer der HUVEC-Kultur in der Inventarliste, „p1“ die erste Passage, und „13.12.2010“ das Datum der Verarbeitung [Kuhn 2005].

2.1.3.5 Förderung der Zelladhäsion

Zur Förderung der Zelladhäsion wurden in einem Versuch mit Endothelzellen neben Gelatine Fibronectin und Basement Membrane Extract (BME) zugesetzt; dies hatte sich bereits in Versuchen von Lavender et al. 2005 und Kubota et al. 1988 bewährt. Nach Äquilibrierung der Plättchen erfolgte die Aussaat der Endothelzellkultur. Insgesamt wurden drei Endothelzellkulturen angesetzt. Neben den oben erwähnten adhäsionsfördernden Stoffen wurde eine Kontrollcharge mit unbehandelter MC hinzugefügt. Die Zellkonzentration betrug 12000 Zellen/Well. Insgesamt wurden vier Entnahmezeitpunkte aus dem Versuchsverlauf

festgelegt, für jeden Bearbeitungszeitpunkt wurde eine Platte vorbereitet. Nach der Aussaat wurden die Platten im Brutschrank inkubiert.

2.2 Mikrokristalline Zellulose (MC)

2.2.1 Eingesetzte MC

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellte MC wurde von der Firma bioregeneration GmbH mit Sitz in Neuried geliefert. Allerdings befand sich der Produktionsprozess noch in der Entwicklung, weshalb keine konstante Materialqualität erreicht werden konnte. Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen wurden jedoch identische Chargen verwendet bzw. verglichen. Geliefert wurde das autoklavierbare Material in A. bidest. Vor jedem Versuch wurde die MC im entsprechenden Medium äquilibriert. Die Besiedelung der MC erfolgte statisch und in der Perfusionsanlage.

Die MC wurde zu Beginn der Versuchsreihen im Durchmesser einer Vertiefung einer 96-Well-Platten, meist in mehreren Chargen, geliefert. Dies hatte den Vorteil, dass die MC gleich passgenau in die Versuchsplatten eingelegt werden konnte. Die MC-Plättchen hatten eine durch den Boden des Wells vorgegebene, plane Auflagefläche und eine konvexe Oberfläche, die der Entwicklung durch das Bakterium *Acetobacter Xylinum* im Well entsprach.

Im Laufe der Zeit entwickelte sich durch mangelhafte Ergebnisse in den Versuchen der Gedanke, dass die vaskulären Zellen auf der konvexen Oberfläche nicht fest genug haften und an den Rand des Wells abrutschen würden. Aus diesem Grund wurde die MC daraufhin nicht mehr in der herkömmlichen Form geliefert, sondern in Form einer DIN-A4-großen Platte. Dies hatte den Vorteil, dass nun statt der kugeligen eine glatte Oberfläche für die Versuche zur Verfügung stand. Dankenswerterweise konnten die MC-Platten in der Fachhochschule Regensburg am Lehrstuhl von Prof. Hammer durch Lasertechnik auf 96-Well-Größe zurechtgeschnitten werden.

Vor jedem Versuch wurde die MC, die in VE-Wasser steril gelagert worden war, autoklaviert. Daraufhin wurden die Chargen in unterschiedliche Zentrifugenröhrchen unter der Sterilbank überführt. Im Anschluss wurde die für den Versuch benötigte Anzahl der MC-Plättchen im geeigneten Medium äquilibriert. SMC-Medium wurde für Glattmuskelzellversuche verwendet, M199-Medium für Endothelzellversuche. Dieser Vorgang erfolgte in den genannten Zentrifugenröhrchen, die, mit Medium befüllt, im Kühlraum bei 6°C über Nacht in einem Überkopfschüttler durchbewegt wurden.

Wenn eine ausreichend hohe Zahl an vaskulären Zellen zur Verfügung stand (vgl. Kultivierung HUVEC und SMC), konnte der Versuch beginnen. Hierfür wurden die Zellen von der Oberfläche mit Trypsin-EDTA abgelöst. Der weitere Vorgang wurde bereits in Punkt 2.1.3.1 beschrieben. Abschließend konnte mithilfe des Zellzählers auf die für die Versuchsanordnung nötige Zellzahl pro Well rückgerechnet und die vaskulären Zellen auf die MC aufgebracht werden.

2.3 Bestimmung von Vitalität und Stoffwechselaktivität in Zellkulturen

2.3.1 MTS-Färbung zur Proliferationsbestimmung

Als Bestandteil und zur Auswertung vieler Versuche konnte die im Zellinneren stattfindende Umwandlung des Substrates 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS-Reagenz) bestimmt werden. Das Ausmaß der Chromogenität, makroskopisch sichtbar in einer bräunlichen Färbung, ist hierbei zu der gemessenen Absorption (optische Dichte (OD)) und damit der metabolischen Zellaktivität direkt proportional [Berridge et al. 2005, Spyridopoulos et al. 1997].

Die Handhabung des Farbstoffs stellte sich folgendermaßen dar:

1. Arbeitsraum abdunkeln, da MTS lichtsensibel ist. Es konnte unsteril gearbeitet werden.
2. MTS angesetzt: Je nach Anzahl der Wells, z.B. 7ml Medium (ohne FKS, mit Supplement) + 1,2ml MTS.
3. Vorhandenes Medium aspirieren.
4. Pro Well 120µl MTS-Gemisch zugeben.
5. Eine Stunde bei 37°C inkubiert.
6. Falls MC im Well, 100µl abgenommen und in neues Well gegeben, MC ebenso in neues Well gegeben. Diese Maßnahme diente der Abschätzung der Zellzahl auf der MC und gab außerdem einen Hinweis darauf, ob und wieviele Zellen sich auf der MC niedergelassen hatten oder ob viele Zellen frei im Medium schwammen bzw. auf Polystyrol (PS) saßen.
7. Zur Bestimmung der Optischen Dichte (OD) wurden die Proben im ELISA-Reader bei 490/650nm ausgemessen.

2.3.2 Multitox-Färbung

Die Färbung mit dem Assay „5MultiTox-Glo, Multiplex Cytotoxicity“ hat die Eigenschaft, zugleich Zellvitalität, Zytotoxizität und Apoptose zu messen. Dieses Assay kann 200 tote Zellen in einer Population von 10.000 lebensfähigen Zellen erkennen [Niles et al. 2007].

Die Anwendung sah wie folgt aus:

1. MC in schwarze Platte gegeben; 50µl Medium mit überführt.
2. GF-AFC (Glycyl-phenylalanyl-amino-fluorocoumerin), 1µl-Aliquot mit 500µl Assaypuffer gemischt, gevortext.
3. 25µl GF-AFC in jedes Well gegeben, vorsichtig gemischt/geklopft.
4. bei 37° / 30 Minuten / abgedunkelt inkubiert.
5. AAF-Glo (Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin) Substrat, x-mg in x-µl Assay-Puffer gemischt, gevortext.

(Konz=8mg ad 500µl). Hier bewährte es sich, ein Eppendorf-Cup in Alufolie zu wickeln und erst am Fluorometer zu pipettieren.

6. Anschließend mit Platte + 25µl-Pipette + AAF-Glo Arbeitslösung im Fluorometer gemessen. Fluoreszenz 400/505 nm (lebende Zellen).
7. Je Well 25µl AAF-Glo zugegeben, Platte kurz und vorsichtig geschüttelt.
8. Pause beendet, Platte wurde eingezogen und 15 Minuten inkubiert, Lumineszenz-Messung (tote Zellen).

2.3.3 Histologische und immunhistologische Färbungen

2.3.3.1 Anfertigung der Präparate

Die Anfertigung der Präparate war im Wesentlichen bei allen immunhistologischen Färbeverfahren ähnlich, teilweise sogar identisch. Färbungen mit Antikörpern (AK) erlauben eine Markierung spezifischer Oberflächenantigene, was eine exakte Differenzierung von zu untersuchenden Objekten möglich macht, beispielsweise eine Unterscheidung zwischen Glattmuskelzellen und Endothelzellen. Die Anfertigung sah folgendermaßen aus:

Die Positivkontrolle der 5µm-Schnitte stellte eine Rattentonsille dar. Auf "Superfrost Plus"-Objektträgern (OT) aus Glas wurden die Schnitte über Nacht bis zwei Tage bei 50° Celsius getrocknet. Daraufhin begann die Waschung der Schnitte wie folgt:

1. Erste Waschung durch PBS.
2. Waschung mit PBS-T (=PBS+0,5ml Tween20 ad 1000ml) an.
3. 2 x 5 Minuten Xylol.
4. 1 x 5 Minuten 100%, 95%, 70% EtOH.
5. 2 x 5 Minuten A.dest.
6. OT für 20 Minuten in Retrieval Solution bei pH 6 kochen.
7. OT für 10 Minuten abkühlen, dann gut mit VE-Wasser waschen.
8. Schnitte trocken, mit Fettstift umranden.
9. 2 x 5 Minuten in VE-Wasser waschen.
10. Für 10 Minuten 3% H₂O₂ in VE, gewaschen.

Diese Schritte dienten der Vorbereitung, der Epitop-Freilegung und der Peroxidase- (POD-) Inaktivierung.

11. Daraufhin 1 x 5 Minuten VE-Wasser.
12. 2 x 5 Minuten PBS.
13. 2 Minuten PBS-T.
14. Lagerung für 30 Minuten in 10% NDS in PBS-T in einer feuchten Kammer.
15. AK-Inkubation: 4° Celsius / feuchte Kammer / über Nacht.

Die sich eigentlich jetzt anschließenden, einzelnen Inkubationen mit Primär- und Sekundärantikörpern werden gesondert dargestellt.

Nach der Antikörperinkubation erfolgte die für alle Färbungen gleichsam wichtige Entstehung des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC). Dieser Komplex ist ursächlich für die Entstehung der bräunlichen Färbung, die später auf den Präparaten im Mikroskop zu erkennen ist.

Avidin-Biotin-Complex:

1. 10µl A+1000µl PBS-T schütteln.
2. 10µl B dazu, vortexen.
3. 30 Minuten ruhenlassen.
4. 3 x 5 Minuten in PBS-T. ABC ebenso für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
5. 1 x 5 Minuten PBS-T, im Anschluss 2 x 5 Minuten PBS.

Anschließend die DAB (Diaminobenzidin)-Markierung:

6. Für 10 Minuten erfolgte die Präinkubation.
7. dann ca. 2 Minuten mit H₂O₂ versehen, unter Beobachtung.
8. Dann 1 Tablette DAB (silberfarben) in 6ml PB gelöst, filtriert, die Schnitte daraufhin für 10 Minuten inkubiert.
9. Im Anschluss 1 Tablette (goldfarben) und 1 Tablette (silberfarben) in 6ml A.dest. lösen, filtrieren, inkubieren und beobachten, Markierung ist braun.
10. Anschließend wieder 1x mit PBS gewaschen, dann 2x 5 Minuten mit VE-Wasser.

Eventuell kann noch eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun durchgeführt werden:

1. Für ½ - 1 Minute in PBS waschen.
2. Kurz in HCl-Alkohol dippen, dann wieder waschen.
3. 5 Minuten bläuen, mit A. dest. waschen.
4. Aufsteigende Alkoholreihe über Xylol weiterführen.
5. Letztlich mit Entellan eindecken.

2.3.3.2 CD31 von der Maus, von-Willebrand-Faktor vom Kaninchen

CD31 und von-Willebrand-Faktor (vWF) sind endothelzellspezifisch Marker, die unterschiedlich stark im humanen Gewebe exprimiert sein können. So ist z.B. ist CD31 vermehrt im Glomerulusepithel nachweisbar, während vWF z.B. mit steigendem Gefäßdurchmesser in der Lunge exprimiert wird [Pusztaszeri et al. 2006].

Die allgemein gleiche Vorgehensweise wurde bereits oben erklärt.

Nun folgen die speziellen primären und sekundären Antikörper:

1. Dako-CD31: 1:50, in PBST+ 5% NHS (normal horse serum) (vorher gekocht).
2. Dako-vWF: 1:80, in PBST+ 5% NHS (vorher gekocht).
3. Sigma-vWF: 1:800, in PBST+ 5% NHS (ohne gekocht).
4. 3 x 5 Minuten in PBS-T.

Darauf folgte die Markierung mit Antikörpern:

5. Der biotinylierte AK anti mouse für CD31 mit 1:300 PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in der feuchten Kammer.
6. der biotinylierter AK anti rabbit für vWF mit 1:300 PBS-T ebenso für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

2.3.3.3 Ki 67 von der Maus

Die Expression des humanen Proteins Ki-67 ist eng mit der Proliferation von Zellen verknüpft, es detektiert diese in der Synthesephase. Das Ki-67-Protein ist während jeder aktiven Phase des Zellzyklus (G_1 , S, G_2 und Mitose) anwesend, inaktiv ist es jedoch bei ruhenden Zellen (G_0). Diese spezifische Eigenschaft des Ki-67-Proteins macht es zu einem herausragenden Marker für die Bestimmung der sogenannten Wachstumsfraktion einer vorgegebenen Zellpopulation [Scholzen et al. 2000].

Die allgemein gleiche Vorgehensweise wurde bereits oben erklärt.

Die speziellen primären und sekundären Antikörper folgen nun:

1. Das Verhältnis Ki67 1:100 in PBS-T und 5% NHS.
2. 3 x 5 Minuten in PBS-T waschen.
3. Der biotinylierte AK anti mouse mit 1:300 PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

2.3.3.4 Glattmuskel- α -Aktin (SMA) aus der Maus

SMA ist das am reichlichsten vorhandene Protein in voll-differenzierten Glattmuskelzellen (SMC). Es wird weder in Myoblasten noch Endothelzellen exprimiert [Shimizu et al. 1995].

Die allgemein gleiche Vorgehensweise wurde bereits oben erklärt.

Die speziellen primären und sekundären Antikörper folgen nun:

1. Das Verhältnis SMA 1:800 in PBST und 5% NHS.
2. 3 x 5 Minuten in PBS waschen.
3. Der biotinylierte AK anti mouse mit 1:300 PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

2.3.3.5 Collagen I + III, Elastin

Die Positivkontrolle der 5 μ m-Schnitte stellt im Gegensatz zu vorher eine Plazenta für Collagen, eine Aorta für Elastin dar. Auf "Superfrost Plus"-Objektträgern (OT) aus Glas wurden die Schnitte zwischen 12 und 48 Stunden bei 50° Celsius getrocknet.

Die Präparate wurden anschließend:

1. 2x 5 Minuten Xylol.
2. 1 x 5 Minuten 100%, 95%, 70% EtOH.
3. 2 x 5 Minuten A.dest.
4. Schnitte trocknen, mit Fettstift umranden.
5. In PBS für 5 Minuten äquilibrieren.
6. 10 Minuten 3% H_2O_2 in PBS, waschen, im Anschluss
7. 3x5 Minuten in PBS waschen.
8. Hyaluronidase 2mg/ml in PBS, für 15 Minuten bei 37°C für Collagen.
9. 1 x Trypsin ebenfalls für 15 Minuten bei 37°C für Elastin.
10. 3 x 5 Minuten PBS, daraufhin 2 Minuten in PBS-T.

11. Schnitte 30 Minuten in 10% NGS (Normal goat serum) in PBS-T in der feuchten Kammer für Collagen, 30 Minuten in 10% NHS in PBS-T in der feuchten Kammer für Elastin.
12. Die Antikörperinkubation über Nacht bei 4°Celsius in der feuchten Kammer statt. Das Verhältnis beträgt für Collagen I + III (rabbit) 1:100 in PBST+0,2% Bovines Serumalbumin (BSA), für Elastin (mouse) 1:2500 in PBST+0,2% BSA.
13. Anschließend 3 x 5 Minuten PBS-T.
14. Der biotinylierte AK goat anti rabbit mit 1:300 PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer, sowohl für Collagen als auch Elastin.

Die Entstehung des ABC-Komplexes und die DAB-Markierung folgen dem gleichen Ablauf wie den beiden oben vorgestellten Antikörpern.

2.3.4 DAPI-Färbung

Die DAPI-Färbung soll einen Eindruck von der Gesamtzahl der Zellen im Vergleich zu den „fluoreszenzpositiven“ Zellen der jeweilig anderen Färbemethode geben.

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der unter UV-Anregung blau fluoresziert. Mit ihm können die Zellkerne spezifisch angefärbt werden, was eine morphologische Beurteilung ermöglicht [Chen 1977, Großgebauer et al. 1976]. Im fortgeschrittenen Stadium ist die Kondensation und Fragmentierung des Kerns an der Entstehung sogenannter „apoptotic bodies“ zu erkennen. Je nach Stadium des apoptotischen Vorganges sind unterschiedlich stark ausgeprägte Unregelmäßigkeiten der Kernmembran zu erkennen, bis hin zum völligen Zerfall des Kerns in kleine Bruchstücke [Technau-Ihling et al. 2001].

2.3.5 HE-Färbung

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalaun eine intensive färbende Eigenschaft entwickelt. Hämalaun färbt alle sauren Strukturen bläulich, wie z.B. DNA oder Zellkerne. Eosin, ein synthetischer Farbstoff, färbt alle basischen Zellstrukturen rötlich, wie z.B. die Proteine des Zytoplasmas [Wachtler 2005]. Mit Hilfe der HE-Färbung können die in Paraffin gebetteten Schnitte im Mikroskop beurteilt und dokumentiert werden. Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Entparaffinieren in Xylol (zweimal) für 5 Minuten.
2. Absteigende Alkoholreihe (pro Alkoholkonzentration 2 Minuten):
100 % Alkohol I, 100 % Alkohol II, 96 % Alkohol I, 96 % Alkohol II, 70 % Alkohol, 50 % Alkohol.
3. mit Aqua dest. waschen.
4. 7-10 Minuten färben in Hämalaun nach Mayer.
5. 10 Minuten fließend wässern unter Leitungswasser.
6. mit Aqua dest. waschen.

Beginn der aufsteigenden Alkoholreihe (pro Alkoholkonzentration 2 Minuten):

7. Erst 50 % Alkohol, dann 70 % Alkohol, daraufhin 96 % Alkohol.
8. 2-3 Minuten färben in Eosin 1 % alkoholisch.
9. 96 % Alkohol; kurz spülen, bis keine Farbwolken mehr abgehen.
10. 100 % Alkohol für 4 Minuten.
11. Terpeneol – Xylol.
12. Xylol 10 Minuten.
13. Eindecken mit Entellan.

2.4 Besiedlung von schlauchförmiger MC mit Endothelzellen aus humanen Umbilicalvenen (HUVEC)

2.4.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung ist bereits ausgeführt worden (s.o.). Die Zellen der 1. und 2. Passage beider Zelllinien wurden für die Versuche verwendet.

2.4.2 Die Perfusionsanlage

Die Besiedelung des schlauchförmigen MC-Materials erfolgte in einer Perfusionsanlage, die zur Herstellung von kleinlumigem Gefäßersatz aus humanen Nabelschnurvenen entwickelt worden war [Hoenicka et al. 2012]. Sowohl die Anlage als auch das Verfahren konnten mit geringen Modifikationen übernommen werden. Jedoch soll hier eine kurze Erläuterung erfolgen. Der künstliche Kreislauf bestand aus einem Membranoxygenator, peristaltischen, getrennt regelbaren Pumpen zur Versorgung der Perfusions- und Superfusionsschleife, einstellbaren Luftreservoirs zur Dämpfung der Pulsation der Pumpen, Wärmetauschern und schließlich den Gefäßkammern, in denen die Präparate befestigt waren. Sowohl die Temperatur in den Gefäßkammern als auch in den Oxygenatoren wurde bei $37 \pm 0,05^\circ\text{C}$ gehalten. Jede Zirkulationsschleife war mit M199 befüllt, supplementiert mit 20% FKS; hier herrschte ebenfalls eine Temperatur von 37°C . Die Oxygenatoren wurden mit einer Mischung aus 20% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid (Rest Stickstoff) perfundiert. Mithilfe eines Blutgasanalysegerätes (Radiometer) konnten neben dem pH-Wert auch O_2 - und CO_2 - Partialdruck abgebildet und aufgezeichnet werden. Um eine kontinuierliche oder auch intermittierende Rotation während des Besiedelungsprozesses aufrechterhalten zu können, wurden die Gefäßkammern mit computergesteuerten Schrittmotoren über Zahnriemen verbunden. Die Rotationsgeschwindigkeit konnte zwischen 0,06 und 60 U/min liegen. Die intermittierend einstellbare Rotation der Gefäßkammer beinhaltete Rotationspausen in justierbarer Länge nach jeweils einer 90° - Drehung, um den Zellen das Herabsinken und die Adhäsion an die Gefäßoberfläche im Sinne einer statischen Besiedlung zu ermöglichen.

2.4.3 Das Vorgehen bei der Besiedelung

Nachdem die schlauchförmige MC (Innendurchmesser 3 mm, Länge 5 cm) in den Gefäßkammern montiert worden waren, wurden die Pumpen, die die Perfusion und Superfusion steuerten, auf 20 bzw. 40 ml/min eingestellt. Die Scaffolds wurden eine Stunde lang unter permanentem Fluß äquilibriert (SMC-Medium mit Supplement und Antibiotikum, 20% O₂). Kurz vor Zellzugabe wurde die Perfusion unterbrochen. Die Superfusion hingegen wurde während des gesamten Besiedelungsvorganges fortgeführt, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung weiterhin zu gewährleisten. Über spezielle Ports wurde die Zellsuspension in die Perfusionsschleife eingeleitet. Im Moment der Zelleinspeisung wurde die automatisierte Rotation gestartet. Es wurde eine intermittierende Rotation mit der niedrigsten Geschwindigkeit und jeweils 3 min Pause zwischen den 90°-Rotationen gewählt. Nach Beendigung des einstündigen Adhäsionsvorganges wurde die Rotation gestoppt. Frisches Medium wurde langsam durch die Perfusionsschleife geleitet, um die verbleibenden freischwimmenden Zellen auszuwaschen und im Lumen des Gefäßes zum Stoffaustausch zu Verfügung zu stehen. Nach dieser kurzen Spülung (10ml/min Medium) wurde die zweite Injektion durchgeführt. Nach einer weiteren Stunde statischer Inkubation wurden die Gefäße bis zum Versuchsende mit 10 ml/min perfundiert. Zur in-Situ-Fixierung wurde vorsichtig 4%iges phosphatgepuffertes Formalin infundiert. Anschließend wurden die MC-Schläuche durch einen Längsschnitt geöffnet und mit DAPI-Lösung (4',6-Diaminidino-2-Phenylindol) inkubiert, welches die Zellkerne durch eine blaue Fluoreszenz markiert. Dann wurde die luminale Seite unter einem UV-Mikroskop betrachtet und Digitalaufnahmen angefertigt.

2.5 Verwendete Materialien, Arbeitsschritte

In Auflistung:

- Fixans Karnovsky für EM: Nur mit PBS statt Cacodylat-Puffer
 - 2g Paraformaldehyd in 50 ml A.dest lösen bei ca 80°C =2%
 - 10 ml 25% Glutaraldehyd =2,5%
 - 10 ml 1,3M Caco-Pu =0,13M
 - 1ml 2,5% CaCl₂ =0,025%
 - ad 100 ml Dest
 - gleich portioniert einfrieren, ca 3-4 Wochen haltbar

- Paraffinschnitte "kochen"
 - 0,01M Citratpuffer = Citronensäure-Monohydrat 2,1g/l
 - 20 Minuten kochen im Dampfdrucktopf (1.Ring), 15 Minuten bei RT abkühlen lassen
 - 2 x 5 Minuten in 200 ml-Küvette und voller Wiege bei ca. 800W Mikrowelle
 - 2 x 7 Minuten ----- dito -----
 - eventuell noch einmal 2 x 7 Minuten kochen
 - Jeweils in den Pausen ca. 50 ml A.dest auffüllen

- Hepes-Pu:
 - 50ml 1M Hepes + 950ml A.dest
 - autoklavieren (steril filtrieren für sofortigen Gebrauch)

- Mowiol-Lösung (zum Eindeckeln von fluoreszenzgefärbten OT)
 - 6,0 g Glycerin wasserfrei
 - 2,5 g Mowiol (Hoechst, z.B. 4/88)
 - 6 ml Dest
 - 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5
 - Im Wasserbad bei 60-80°C rühren bis gelöst, dann unter Rühren auf Eis abkühlen
 - Gebrauchslösung: 1 Wo haltbar (bei 4°)
 - 25 mg Dabko (1,4 Dazabicyclo-2,2-octane, Sigma) in 1 ml Mowiol lösen

- Gelatine-Lösung 0,25% für Kulturschalen in PBS oder Dest
 - Zugabe von 500µl/100ml Gentamycin 10mg/ml (Seromed)
 - 30Minuten. bei 37° inkubieren, absaugen, nicht trocknen lassen, Zellen ausplattieren

- Medium für Nabelschüre
 - M199 o.Glutamin + Supplementmix (Promocell)
 - Zugabe von 10%FKS + 1ml Amphotericin 50 ng/ml+0,5ml
 - Gentamycin 50 µg/ml
 - Glutamin

- „M199 with Earle’s salts“ (PAA) ergänzt durch 10% fetales Kälberserum (PAA), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml; Roche), Gentamycin (100 µg/ml; Roche) und eine Supplementierung für Endothelzellmedien (jeweilige Endkonzentration: FCS 0,02 ml/ml, ECGS/H 4,00µl/ml, human rec. EGF 0,10 ng/ml, human rec. bFGF 1,00 ng/ml, Hydrokortison 1,00ng/ml, Gentamycin 50,00 µg/ml, Amphotericin B 50,00 ng/ml; Provitro)
- Smooth muscle cell medium (Promocell)
- PBS:

10x/ 1 liter	10x/ 5 liter
2g KCL	10g
2g KH ₂ PO ₄	10g
80 g NaCl	400g
15,35g Na ₂ HPO ₄	76,75 g

pH exakt auf 6,78 einstellen (mit Wasser verdünnt=pH 7,4)
- PB-Puffer: siehe PBS, allerdings ohne NaCl
- Collagenase A 0,05% (Boehringer)
 - 0,05g Collagenase
 - 50ml Dest
 - 2ml Hepes (1M, =50x)
 - mit Dest auf 100ml auffüllen,
 - mindestens 10 Minuten auf Eis stehen lassen, steril filtrieren (0,45 oder 0,2 µm)
- Trypsin-EDTA (Sigma)
- Proteinase K (Merck)
- Ethylendiamintetraacetat (Merck)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)
- Calf thymus DNA Type I (Sigma)
- GF-AFC (Promega)
- AAF-Glo (Promega)
- Bisbenzimid H33258 (Sigma)
- Calcein AM 1 g/ml (Molecular Probes)
- 5MultiTox-Glo, Multiplex Cytotoxicity (Promega)

- CD31 (Dako)
- von-Willebrand-Faktor (Sigma)
- von-Willebrand-Faktor (Dako)
- Ki67 (Dako)
- SMA (Sigma)
- Entellan (Merck)
- Nabelschnur-Transportlösung (Krebs-Henseleit-Puffer):
 Jeweils ca. 100 ml in sterile Dosen füllen, gut verschließen, mit blauem Aufkleber versehen.
 Inhalt:
 800 ml A.bidest.
 2,1 g NaHCO₃ (25 mM)
 5,95 g HEPES (25 mM)
 100 ml KH Stammlösung
 2 ml Glucose-Stammlösung 250x (5,5 mM)
 1,2 ml CaCl₂ 1 M (1,2 mM)
 20 ml Pen-Strep
 pH 7,4
 mit A.bidest auf 1000 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4°C lagern.
- MTS-Reagenz (Promega)
- Dampfsterilisator Varioklav (H&T Labortechnik)
- Trockensterilisator (WTB Binder)
- schwarze 96-Well-Platte (BD Biotechnologies)
- Blutgasanalysegerät (ABL 800, Radiometer, Willich)
- Mischung aus 20% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid (balance nitrogen, Linde)
- Einmalhandschuhe (Hartmann)
- Sterilbank (Heraeus)
- Brutschrank (Heraeus)
- Abdecktuch, steril (Hartmann)
- Pinzette, steril (Pilling)

- Skalpell, steril (Feather)
- Venenverweilkanüle, 18G (Braun)
- Gefäßklemme, steril (Pilling)
- Chirurgische Schere, steril (F.S.T.)
- Zentrifugenröhrchen, 50ml (Greiner)
- Zentrifugenröhrchen, 2ml (Eppendorf)
- Zentrifuge (Heraeus)
- T25-, T75-Kulturgefäß (Nunc)
- Well-Platten, 6-96 Well (Nunc)
- Standschüttler Vortex (Scientific Industries)
- 70µm-Zellfilter (Millipore Corporation)
- "Superfrost Plus"-Objektträgern (OT) aus Glas
- Fibronectin (Chemicon)
- BME (Cultrex)
- Normal donkey serum, normal goat serum, normal horse serum (Sigma)
- Diaminobenzidin (Sigma)
- Bovines Serumalbumin (Sigma)

3. Ergebnisse

Die Fragestellung bei den im Anschluss vorgestellten Versuchen beruhte im Kern darauf, die Adhäsionsfähigkeit der unterschiedlichen humanen Zellen, Glattmuskelzellen (SMC) und Endothelzellen (EC), auf die Oberfläche der MC zu testen. Wie Vorversuche zeigten, konnten beide Zelltypen zu Polystyrol (PS) eine Bindung herstellen. Eine weitere Frage sollte zeigen, in welcher Form sich die Zellen auf der Zellulose absetzten, ob sie konfluent wuchsen oder intermittierend Zellverbände bildeten und ob sie sich als Monolayer oder mehrreihig darstellten.

Insgesamt wurden vier Versuchsreihen durchgeführt und ausgewertet: Die Besiedelung der MC-Plättchen mit Glattmuskelzellen, die Besiedelung mit Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen und die Kombination aus beiden, EC auf SMC auf MC-Plättchen, welcher dem anatomischen Aufbau einer Arterie am nächsten kommt.

Als letztes wurde noch der Versuch der Besiedelung von MC-Schläuchen mit Endothelzellen durchgeführt und ausgewertet.

3.1 Besiedelung der mikrokristallinen Zellulose mit vaskulären Zellen

3.1.1 Besiedelung der MC mit Glattmuskelzellen durch Beschleunigung

Versuchsbedingungen	Materialien	Zellkulturen	Auswertung
Zentrifugale Beschleunigung, ein Endpunkt, 96-Well-Platte	1 MC-Charge	1 SMC-Kultur	Lichtmikroskop, Zellproliferationsmessung

Neben dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Verfahren der statischen Besiedelung der mikrokristallinen Zellulose (MC) mit vaskulären Zellen wurde im hier ausgeführten Versuch das Ergebnis einer beschleunigten Besiedelung untersucht. Dieser Ansatz hatte zum Ziel, die Glattmuskelzellen mithilfe unterschiedlicher Erdbeschleunigung (g) auf das Trägermaterial MC zu bringen. Zudem sollte neben der Besiedelung durch Beschleunigung auch durch Penetration der Oberfläche ein Eindringen der Zellen in das Material erreicht werden. Der Versuchsaufbau orientierte sich an den Artikeln von Roh et al. 2007 und Bäckdahl et al. 2006.

Hierfür wurden drei 96-Well-Platten, eine MC-Charge und eine SMC-Kultur vorbereitet. Nach Äquilibrierung der MC-Plättchen begann deren Überführung in eine 96-Well-Platte. Nachdem 150 µl der SMC-Suspension (Konzentration 1×10^7 Zellen/ml) in die Wells pipettiert worden waren, wurden drei Versuchsanordnungen durchgeführt:

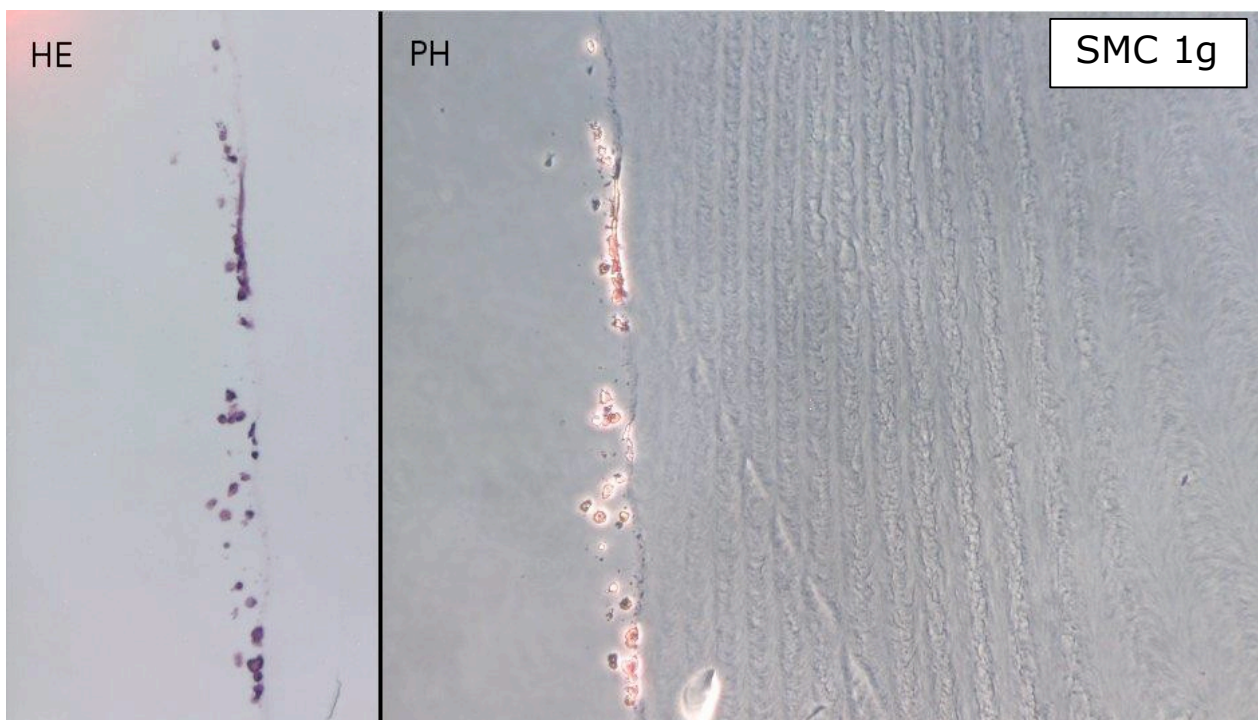
Eine Platte, die sog. 1g-Platte, wurde, nachdem die Suspension zugegeben und der Überstand mehrmals mit einer Pipette aufgezogen und wieder ins Well gegeben worden war, ohne weitere Anwendungen, d.h. zentrifugale Beschleunigung, im Versuch belassen.

Die zweite Platte, die sog. 294g-Platte, wurde identisch zur 1g-Platte vorbereitet. Jedoch wurde sie viermal hintereinander mit 294g (entspricht 1303 U/m) zentrifugiert. Nach der ersten, zweiten und dritten Zentrifugation wurden die MC-Plättchen vorsichtig aus dem Well genommen, dann wurde das Well mehrmals suspendiert, im Anschluss wurde das Plättchen wieder eingelegt und die Suspension wieder aufgeträufelt. Dadurch sollten eventuell am Polystyrol haftende Zellen abgelöst werden und erneut in die Suspension gelangen können.

Mit der dritten Platte, der sog. 662g-Platte, wurde analog zur 294g-Platte vorgegangen, jedoch wurde sie mit 662g (entspricht 1955 U/m) zentrifugiert.

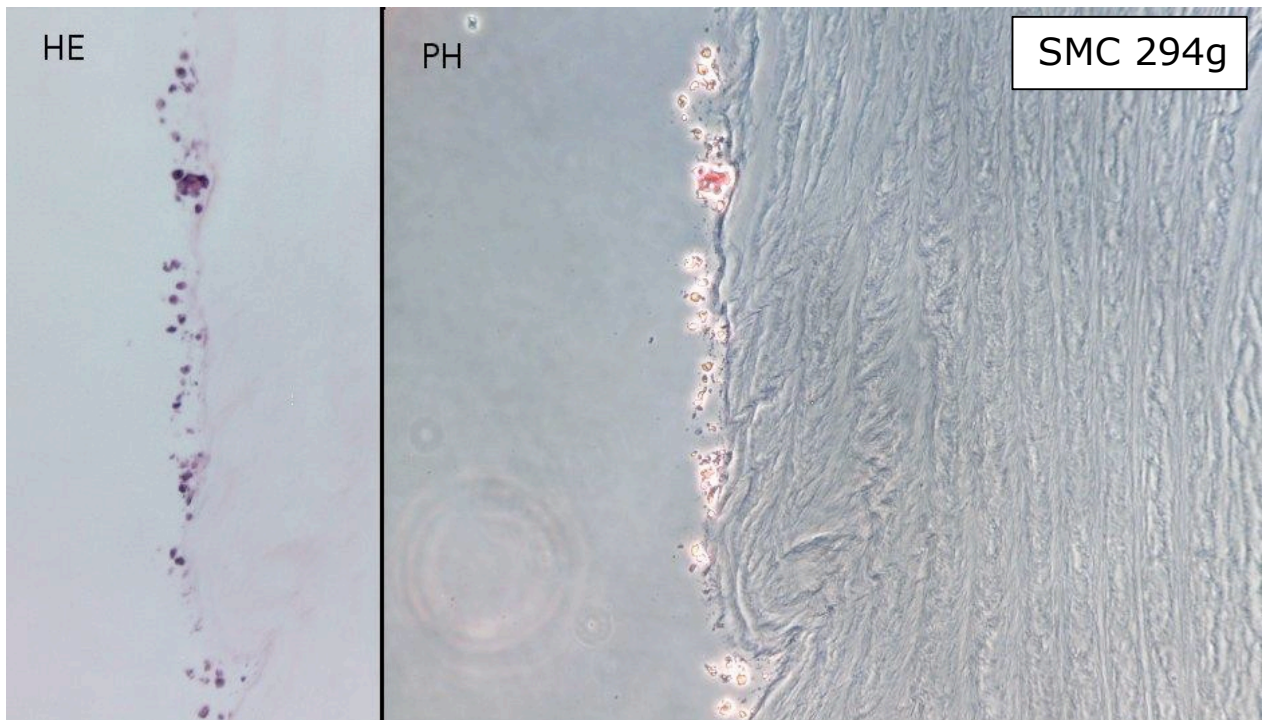
Nach der Zentrifugation wurden alle MC-Plättchen mit Eisenringen auf dem Wellboden fixiert, um ein Aufschwimmen der MC zu verhindern. Dann wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und im Anschluss für zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert. Zwei MC-Sheets und eine SMC-Verdünnungsreihe dienten als Kontroll- und Vergleichssystem.

Nach MTS-Inkubation für MC und Well wurde ein Plättchen für Histologie in Paraformaldehyd fixiert, mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt und unter dem Lichtmikroskop und im Phasenkontrast (PH) photographiert.

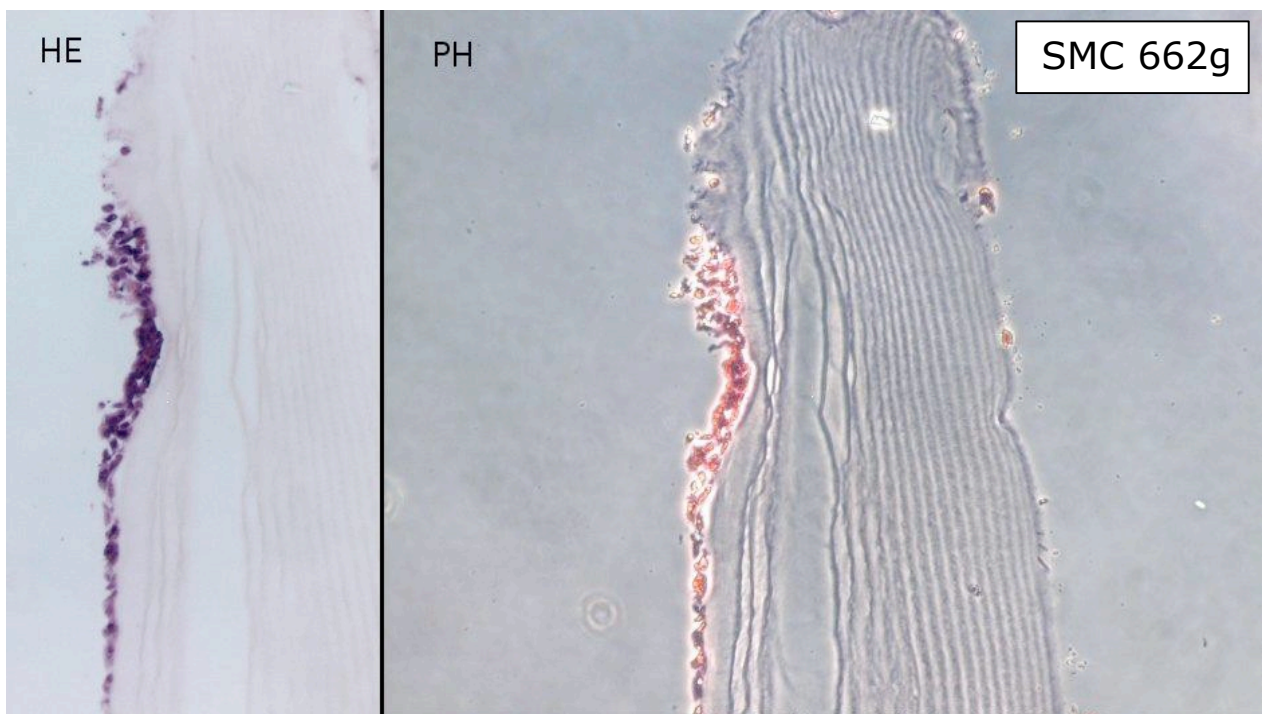


(Abb. I)

Abb. I zeigt die Besiedelung von MC mit SMC mit 1g Erdbeschleunigung.



(Abb. II)
Abb. II zeigt die Besiedelung von MC mit SMC mit 294g Erdbeschleunigung.

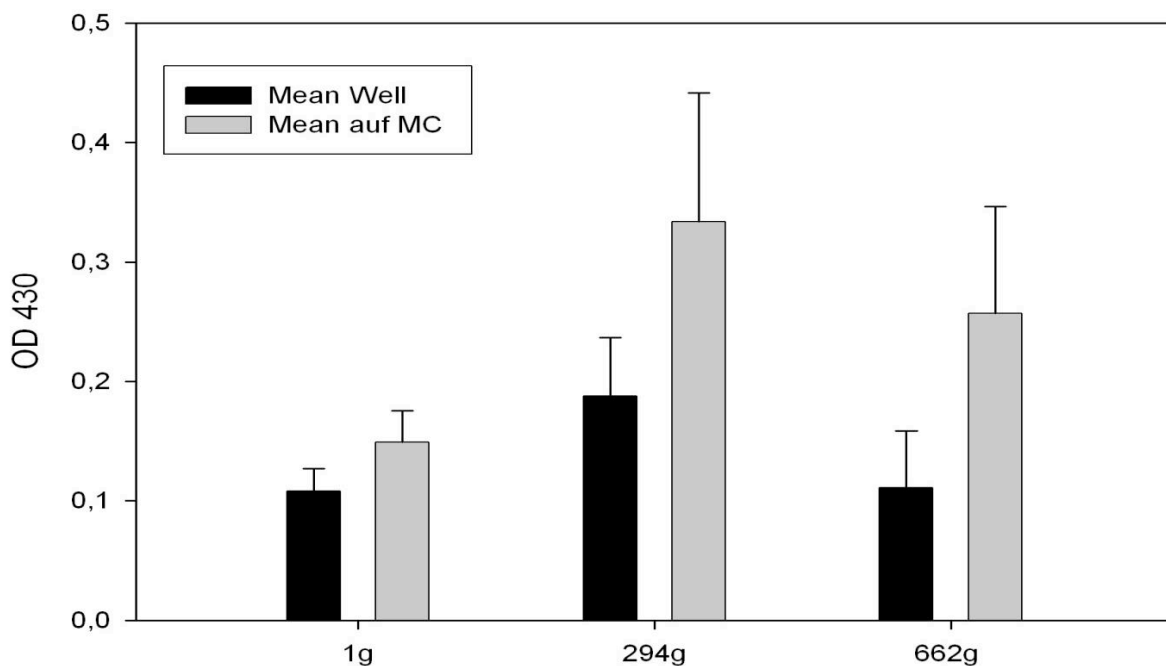


(Abb. III)
Abb. III zeigt die Besiedelung von MC mit SMC mit 662g Erdbeschleunigung.

Die Abb. I-III stellen das histologische Ergebnis eines unterschiedlich stark beschleunigten Besiedelungsversuchs dar. Hierbei wurden Glattmuskelzellen mithilfe unterschiedlich starker Erdbeschleunigung (1g, 294g, 662g) auf das Trägermaterial MC aufgebracht. Die Bilder zeigen, dass sich zwar mit steigendem g mehr Zellen auf der Oberfläche finden, diese jedoch keinerlei Tendenz zur Penetration der Oberfläche zeigen oder diese konfluent besiedeln. Zudem nimmt die Verformung des Trägermaterials mit steigender Erdbeschleunigung deutlich zu. Die lichtmikroskopischen Aunahmen wurden in 20facher Vergrößerung durchgeführt (HE: Hämalaun-Eosin, PH: Phasenkontrast).

In der Auswertung konnte gezeigt werden, dass der Durchmesser der MC-Charge mit zunehmender Erdbeschleunigung abnahm.

Ebenso wurde deutlich, dass sich eine höhere Beschleunigung nicht positiv auf das Penetrationsverhalten der Glattmuskelzellen auswirkte. Im HE-Färbeverfahren konnte dies klar nachwiesen werden (s. Abb. I-III). Zudem wurde deutlich, dass das MC-Gerüst zwar porös war, die Faserstruktur sich jedoch für die Glattmuskelzellen als so ungünstig darstellte, dass kein Eintritt in das Plättchen erzielt werden konnte. Zusätzlich fiel bei Begutachtung der MTS-Werte auf, dass sich trotz Zentrifugation und mehrfachen Resuspendierens noch relativ viele Zellen im Well auf Polystyrol (PS)-Boden und/oder -Seitenwand befanden und nicht auf dem MC-Plättchen (s. Abb. IV).



(Abb. IV)

Abb. IV zeigt die Proliferationsentwicklung für den oben histologisch vorgestellten beschleunigten Besiedelungsversuch mittels eines MTS-Proliferationsassays. Die Werte wurden bei einer Wellenlänge von 430nm gewonnen. Es wird deutlich, dass trotz mehrfachen Resuspendierens und Zentrifugierens ein deutlicher Anteil an Glattmuskelzellen auf PS haften blieb. Zudem scheint es durch die erhöhte Rotation zu einem Absterben der Zellen gekommen zu sein.

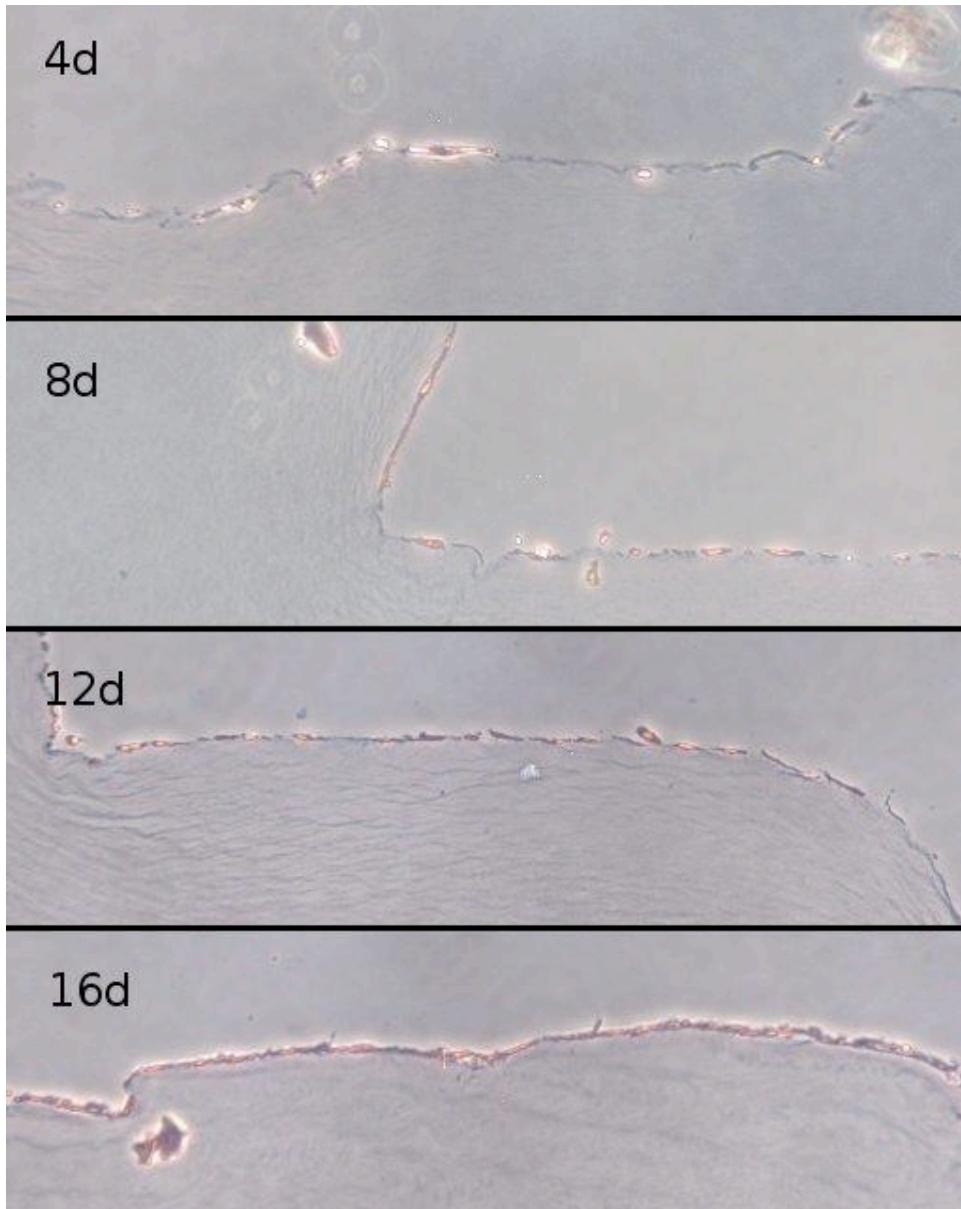
3.1.2 Besiedelung der MC mit Glattmuskelzellen und Endothelzellen

Versuchsbedingungen	Materialien	Zellkulturen	Auswertung
Statisches Besiedeln, mehrere Entnahmezeitpunkte, 96-Well-Platte	3 MC-Chargen	1 SMC-Kultur, 1 EC-Kultur	Lichtmikroskop, Zellproliferationsmessung, Immunhistochemie, Rasterelektronenmikroskop

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob sich Endothelzellen leichter auf einer vorher aufgetragenen Schicht aus Glattmuskelzellen absetzen, als auf unbehandeltem MC. Im Querschnitt betrachtet sollte sich das

Versuchsergebnis an den anatomischen Aufbau eines Blutgefäßes anlehnen.

Nach oben beschriebener Kultivierung der Zellen und Äquilibrierung der für diesen Versuch benötigten drei Chargen der MC wurden hierfür zwei Zellkonzentrationen (25000 und 50000 Zellen/ml) einer SMC-Kultur auf die vorher ausplattierte MC auf sieben 96-Well-Platten verteilt. Jede Platte sollte für einen Untersuchungszeitraum zur Verfügung stehen. Hierauf wurden die Wells mit den oben beschriebenen Eisenringen versehen, um ein Auftauchen der MC zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Platten im Wärmeschrank für 20 Tage bei 37°C bebrütet, an jedem dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit SMC-Medium. Zusätzlich wurde zur Standardisierung der Versuch mit einer SMC-Verdünnung auf PS validiert. Hier konnte ein lineares Wachstum der Zellen nachgewiesen werden. Nach einem Tag wurde eine Platte aus dem Versuch genommen und zur Auswertung vorbereitet. Es wurden MTS-Werte gewonnen, zudem wurden die Präparate DAPI-gefärbt und dann, in Formalin fixiert, für die histologische Auswertung vorbereitet. In einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass nach etwa 16 Tagen eine Konfluenz auf der MC-Oberfläche zu erwarten ist (s. Abb. V).



(Abb. V)

Die Abb. V zeigt, im Phasenkontrast photographiert, den zeitlichen Verlauf einer statischen Besiedelung von MC mit Glattmuskelzellen. Man erkennt nach vier Tagen (4d) eine unzusammenhängende Schicht von Zellen, die im Verlauf immer dichter wird, bis sich schließlich ein Monolayer aus SMC am 16. Tag (16d) gebildet hat. Zudem stellt sich die Struktur der MC, in den Bildern jeweils am Unterrand, deutlich dar. Die lichtmikroskopischen Aunahmen wurden in 10facher Vergrößerung durchgeführt.

In weiteren Vorversuchen auf PS wurde deutlich, dass die Glattmuskelzellen mit der Bildung des Monolayer ihre Wachstumstendenz nicht einbüßen, sondern vielmehr in mehreren Schichten übereinander weiterwachsen, was eine Besiedelung durch Endothelzellen eventuell verschlechtert hätte. Aus diesem Grund wurde nach 20 Tagen, also nach Annahme einer ausreichenden Monolayerbildung, der Versuch um die Auflage von EC erweitert. Hierfür wurde eine Endothelzellkultur in der Konzentration von 2000 Zellen/ml auf die Wells verteilt. Analog zur SMC-Standardkurve wurden auch Endothelzellen ausplattiert, die ein ebenso lineares Wachstum auf PS nachwiesen. Ab dem 16. Tag der Bebrütung mit Glattmuskelzellen wurde zum reinen SMC-Medium eine identische Menge

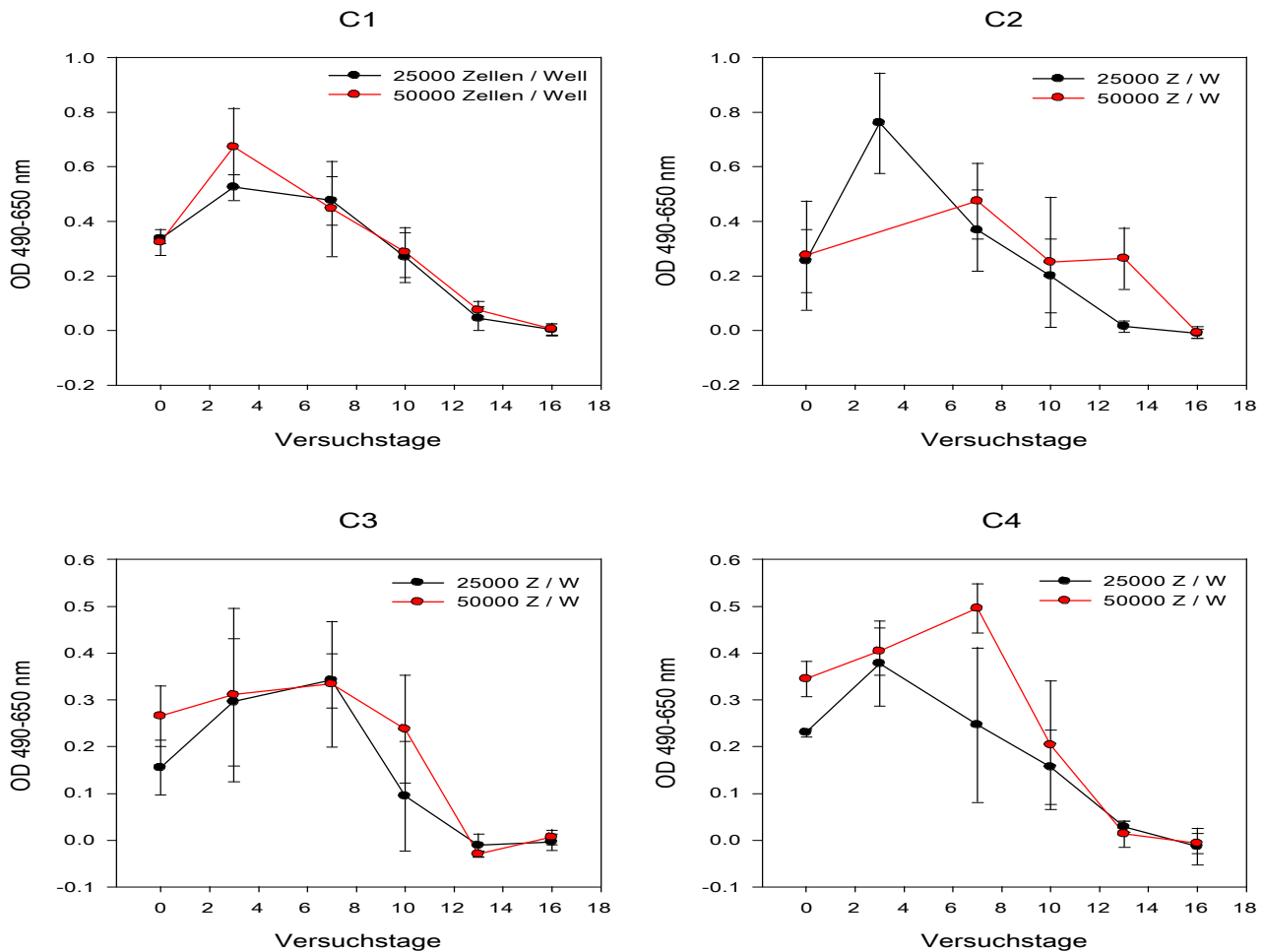
an M199-Medium für Endothelzellen hinzugegeben, um die SMC schon an die neue Medienzusammensetzung zu gewöhnen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass sowohl Glattmuskelzellen, die einen anspruchsloseren Bedarf an Nährstoffsubstitution haben, als auch Endothelzellen, die eines hochwertigeren Mediums bedürfen, mit der 50-50-Mischung der Medien am besten zurechtkommen. Am 20. Tag wurde, vor Zugabe der Endothelzellen, wiederum eine Platte aus dem Versuch genommen. Mit ihr wurde in der gleichen Weise verfahren, wie es bereits oben für den ersten Tag beschrieben worden war.

Am vierten Tag nach Endothelzellzugabe wurde eine Platte entnommen. Es folgte dann die gleiche Probenaufbereitung wie bei den zuvor entnommenen Platten am ersten und 20. Tag, zusätzlich wurden noch histologische Färbungen zum EC-Nachweis angewendet. Am siebten, zehnten, 13. und 16. Tag nach Endothelzellzugabe erfolgte die gleiche Prozedur. Hiermit war der Versuch beendet.

Die histologischen Färbungen wurden für den SMC-Nachweis mit dem SMC-AK, für die Endothelzellen mit CD31- und vWF-AK durchgeführt. Zusätzlich wurde als unspezifischer Antikörper ein Collagen-AK beigebracht. Die einzelnen AK sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

- Collagen (unspezifisch, bräunliche Färbung; Problem: erst ab einer gewissen Zellzahl und Dichte kann die Expression von Collagen durch Zellen nachgewiesen werden)
- CD31 (EC-spezifisch, bräunliche Färbung; Problem: benötigt ebenso wie Collagen-AK dichte Zellzahl und eine möglichst dichte Endothelzellschicht)
- SMC (SMC-spezifisch, bräunliche Färbung; Problem: Zellen sollten noch kontraktile sein und nicht schon fibroblastenartig)
- vWF (EC-spezifisch, bräunliche Färbung; Besonderheit: intrazellulär nachweisbar, auch in der subendothelialen Matrix zu finden; nicht so sehr auf Konfluenz angewiesen)

Die Ergebnisse zeigten einen negativen Trend, die MTS-Werte (s. Abb VI) belegten die histologischen (s. Abb. VII-XIV) und elektronenmikroskopischen Bilder (s. Abb. XV bis XVIII).



(Abb. VI)

Die Abb. VI zeigt den zeitlichen Verlauf eines Versuches, bei dem auf eine Unterlage aus mikrokristalliner Zellulose zuerst Glattmuskelzellen und dann Endothelzellen ausgebracht wurden. Hier wird nur der Zeitpunkt ab der Endothelzellzugabe gezeigt. Die Kurve setzt sich aus der gemessenen OD (MTS-Färbung) und der Anzahl der Tage zusammen. Man erkennt deutlich, dass für alle MC-Chargen (C1-C4) ein Abfall der optischen Dichte und damit der Zellzahl zu verzeichnen ist.

Es zeigte sich in allen Aufnahmen kein Hinweis für Wachstum, die Zellen konnten keine Verbindung zum Trägermaterial bilden, was in den folgenden Abbildungen klar zu sehen ist. Endothelzellen sind auf keinem der Bilder eindeutig zu erkennen, die Formationen, die sich darstellen, scheinen SMC oder Fibroblasten zu sein. Die Aufnahmen sind zudem nicht exemplarisch für das gesamte Plättchen, sie zeigen nur die Ausschnitte, auf denen überhaupt etwas zu finden war; der größte Teil der Plättchen war nämlich unbedeckt, nur etwa 10% der Oberfläche zeigten lose Zellverbände. Gezeigt werden hier nur die Aufnahmen der Tage 4 und 13 nach Aussaat, da sich diese zur Gewinnung eines Eindrucks über das Ergebnis in adäquatem Maße eignen. Da Tag 16 im MTS-Protokoll keine wesentlichen Änderungen zeigte, wurde Tag 13 als Endpunkt des Versuchs gewertet.



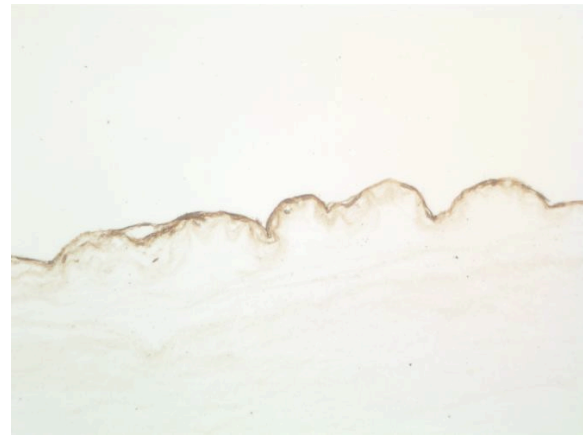
(Abb. VII)
Abb. VII zeigt den Tag 4 nach Aussaat EC in der Collagen-AK-Färbung.



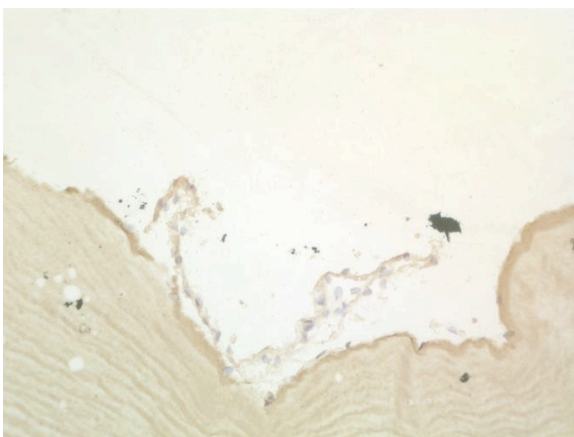
(Abb. VIII)
Abb. VIII zeigt den Tag 4 nach Aussaat EC in CD31-AK-Färbung.



(Abb. IX)
Abb. IX zeigt den Tag 4 nach Aussaat EC in der SMC-AK-Färbung.



(Abb. X)
Abb. X zeigt den Tag 4 nach Aussaat EC in vWF-AK-Färbung.



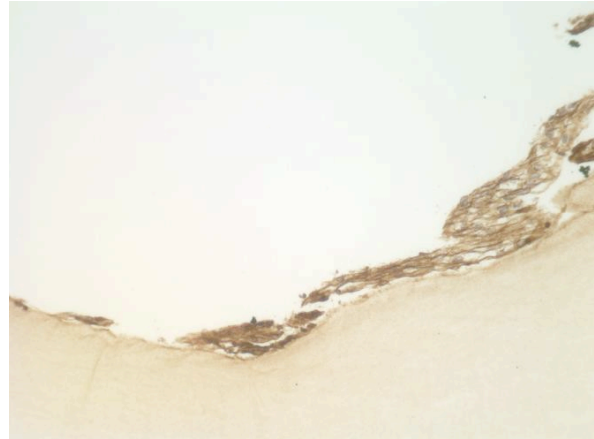
(Abb. XI)
Abb. XI zeigt den Tag 13 nach Aussaat EC in der Collagen-AK-Färbung.



(Abb. XII)
Abb. XII zeigt den Tag 13 nach Aussaat EC in CD31-AK-Färbung.

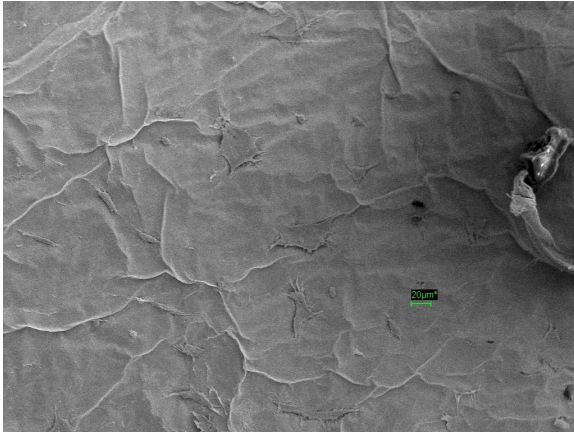


(Abb. XIII)
Abb. XIII zeigt den Tag 13 nach Aussaat EC in der SMC-AK-Färbung.

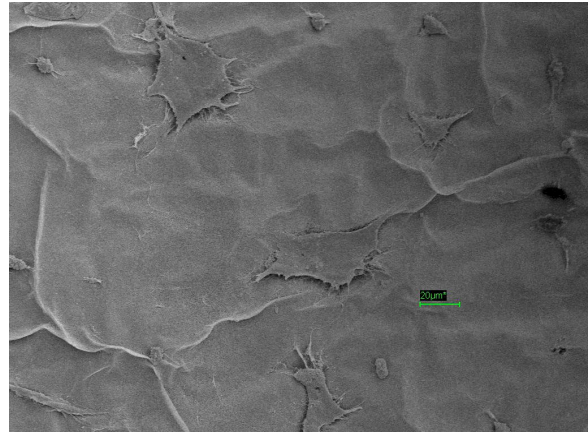


(Abb. XIV)
Abb. XIV zeigt den Tag 4 nach Aussaat EC in vWF-AK-Färbung.

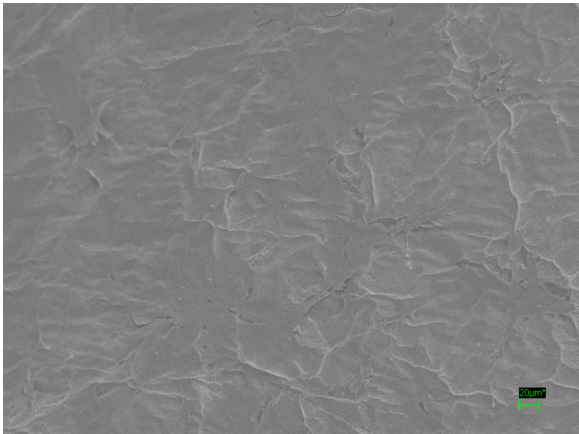
Die Abb. VII-XIV zeigen in lichtmikroskopischen Bildern den zeitlichen Verlauf eines Versuches, bei dem auf eine Unterlage aus mikrokristalliner Zellulose zuerst Glattmuskelzellen und dann Endothelzellen ausgebracht wurden, hier im Überblick nur die Zeitpunkte ab der Endothelzellzugabe. Analog zum Abfall der in Abb. VI gezeigten optischen Dichte sowie der damit verbundenen aktiven Zellzahl wachsen die Zellen nicht ins Trägermaterial ein, heben sich schon teilweise nach kurzer Zeit von der Oberfläche der MC ab. Die SMC scheinen nach ca. 24 bis 27 Tagen nicht mehr ursprünglich zu sein, evtl. hat ein fibroblastärer Umbau stattgefunden. Die EC haften eher nicht auf der SMC-Unterlage. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden in 20facher Vergrößerung durchgeführt.



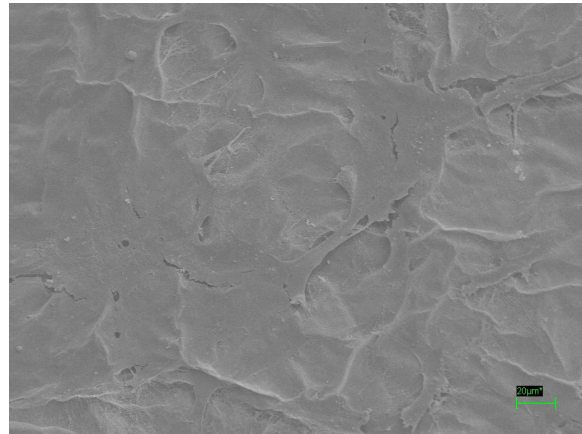
(Abb. XV)
Abb. XV zeigt die mit EC besiedelter MC im raster-
elektronischen Bild nach Tag 4 der EC-Aussaat.



(Abb. XVI)
Abb. XVI zeigt die mit EC besiedelte MC im raster-
elektronischen Bild nach Tag 4 der EC-Aussaat.



(Abb. XVII)
Abb. XVII zeigt die mit EC besiedelter MC im raster-
elektronischen Bild nach Tag 13 der EC-Aussaat.



(Abb. XVIII)
Abb. XVIII zeigt die mit EC besiedelte MC im raster-
elektronischen Bild nach Tag 13 der EC-Aussaat.

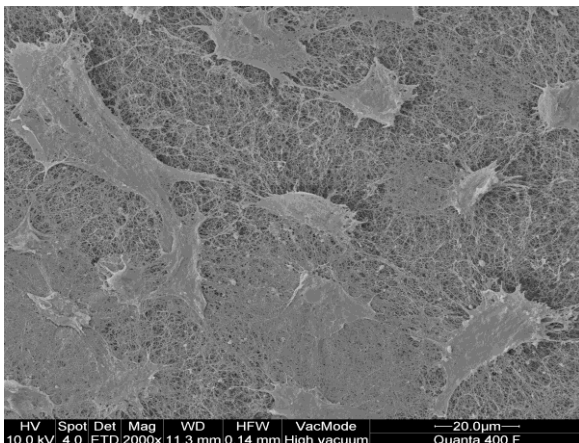
Die Abb. XV-XVIII zeigen in rasterelektronenmikroskopischen Bildern den zeitlichen Verlauf eines Versuches, bei dem auf eine Unterlage aus mikrokristalliner Zellulose zuerst Glattmuskelzellen und anschließend Endothelzellen ausgebracht wurden, hier im Überblick nur die Zeitpunkte ab der Endothelzellzugabe. Analog zum Abfall der in Abb. VI gezeigten optischen Dichte sowie der damit verbundenen aktiven Zellzahl wachsen die Zellen nicht ins Trägermaterial ein. Die Aufnahmen wurden mit 200- und 400facher Vergrößerung durchgeführt.

3.1.3 Besiedelung der MC mit Endothelzellen

Versuchsbedingungen	Materialien	Zellkulturen	Auswertung
Statisches Besiedeln, 2 Entnahmezeitpunkte, Zugabe adhäsionsfördernder Stoffe, 96-Well-Platte	2 MC-Chargen, unbehandelt/glatt	2 EC-Kulturen	Lichtmikroskop, Rasterelektronenmikroskop

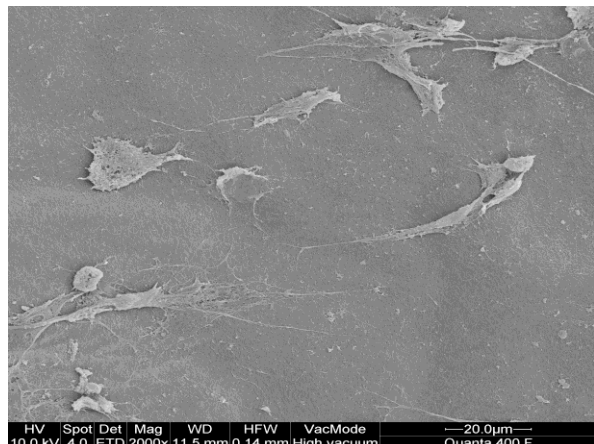
Hier wurde untersucht, ob sich Endothelzellen ohne SMC-Unterlage auf der MC absetzen würden.

In Vorversuchen hatten sich bereits in der Zusammenschau der MTS-Werte und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Schwierigkeiten bei der direkten Besiedelung der MC ohne Vorbehandlung der Oberfläche oder Zugabe von adhäsionsfördernden Verbindungen gezeigt (s. Abb. XIX-XX). In diesem Versuch war die zu besiedelnde Oberfläche der MC noch unterschiedlich im Vergleich zu den späteren; die MC-Plättchen hatten eine plane Auflagefläche, die durch den Boden des Wells vorgegeben war, und eine konvexe Oberfläche, die der Entwicklung durch das Bakterium *Acetobacter xylinum* im Well entsprach. Die Zellkonzentration betrug 12000 Zellen/Well.



(Abb. XIX)

Abb. XIX zeigt den Tag 13 nach Aussaat EC auf auf der unbehandelten konvexen MC-Oberfläche.



(Abb. XX)

Abb. XX zeigt den Tag 13 nach Aussaat EC auf der unbehandelten planen MC-Oberfläche.

Die Abb. XIX und XX zeigen in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen die Entwicklung einer Endothelzellkultur auf unbehandelter MC. Die Zellkonzentration betrug 12000 Zellen/Well. Vereinzelt sind Zellen zu erkennen, von Konfluenz jedoch weit entfernt. Die Bilder sind in 2000facher Vergrößerung aufgenommen.

Es konnten zwar Zellen auf der Oberfläche nachgewiesen werden, jedoch ohne Bildung eines konfluenten Zellrasens.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik der nicht einzuschätzenden Oberflächenbeschaffenheit der MC und der daraus resultierenden Unsicherheit bezüglich der Niederlassungsfreudigkeit der vaskulären Zellen wurden die MC-Plättchen in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei der ersten Gruppe blieb die Plättchenoberfläche unangetastet, die Plättchen der zweiten Gruppe hingegen wurden mithilfe einer Skalpellklinge glattgeschabt, um die im Nachfolgenden beschriebenen, zipfelartigen

Ausläufer zu entfernen oder zumindest in ihrer Anzahl deutlich zu reduzieren. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Versuch wurde diesmal eine Plättchengröße gewählt, die nicht dem Welldurchmesser einer 96-Well-Platte, sondern dem einer 6-Well-Platte entsprach. Dies sollte die histologische Bearbeitung vereinfachen und Störfaktoren, wie z.B. die höhere Affinität der Endothelzellen zu PS, möglichst klein halten. Außerdem wurden verschiedene zelladhäsionsfördernde Stoffe, Fibronectin, BME und Gelatine, zugesetzt. Obwohl Vorversuche zeigen konnten, dass sich bei Vorlage von Gelatine im Vergleich zu PS die Adhäsionsfreudigkeit von Endothelzellen auf die MC eher verschlechtert, bot sich aufgrund der neu erworbenen Erkenntnisse bzw. Annahme, wie z.B. der Umstellung von in der 96-Well-Platte geformten MC zum lasergesteuerten Zuschnitt aus einer MC-Platte, eine Hinzunahme von Gelatine an. Die vierte Gruppe der Plättchen blieb zur Kontrolle unbehandelt. Wie bei allen anderen Versuchen erfolgte am dritten Tag der Mediumwechsel mit frischem M199.

Gezeigt werden nur Ausschnitte der angefertigten Präparate, die Bilder sind jedoch repräsentativ für die Gesamtoberfläche des Plättchens. Die vaskulären Zellen konnten keinerlei Kontakt oder Haftfläche zum Untergrund ausbilden und kamen so teilweise übereinanderliegend zur Abbildung. Im Vergleich zu den anderen Auswertungszeitpunkten waren die Ergebnisse bei Tag 1 noch am vielversprechendsten, allerdings nahm die Ergebnisqualität mit zunehmender Dauer ab. Aus diesem Grund wurden nur die Tage 1 und 10 gezeigt, da sie für den Gesamteindruck ausreichend eindrücklich waren und den Anfangs- und Endpunkt des Versuchs demonstrierten. Es zeigte sich aber, dass die Adhäsionsfreudigkeit der EC bei Fibronectinzugabe höher zu sein schien als bei den anderen Zusatzstoffen oder der unbehandelten Kontrollgruppe. Exemplarisch soll an den Färbungen mit Fibronectinzugabe der Verlauf auf der rauen, unbehandelten und glatten, abgeschabten Oberfläche gezeigt werden (s. Abb. XXI bis XXIV).



(Abb. XXI)
Abb. XXI zeigt den Tag 1 nach Aussaat EC auf auf der unbehandelten, rauen MC-Oberfläche.

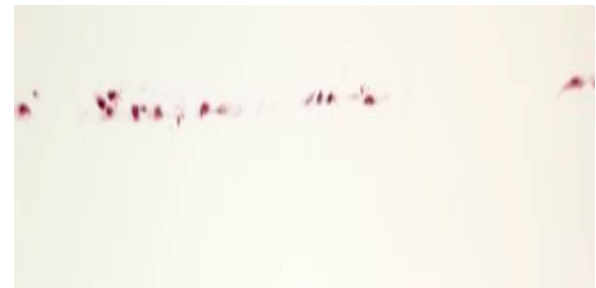


(Abb. XXII)
Abb. XXII zeigt den Tag 1 nach Aussaat EC auf der glatten, abgeschabten MC-Oberfläche.

Die Abb. XXI und XXII demonstrieren in HE-gefärbten lichtmikroskopischen Aufnahmen die Entwicklung einer Endothelzellkultur auf unbehandelter, rauer und glatter, abgeschabter MC am Tag 1 nach Aussaat. Die Zellkonzentration betrug 12000 Zellen/Well. Vereinzelt sind Zellen zu erkennen, von Konfluenz jedoch weit entfernt. Die Bilder sind in 20facher Vergrößerung aufgenommen.



(Abb. XXIII)
Abb. XXIII zeigt den Tag 10 nach Aussaat EC auf auf der unbehandelten, rauen MC-Oberfläche.



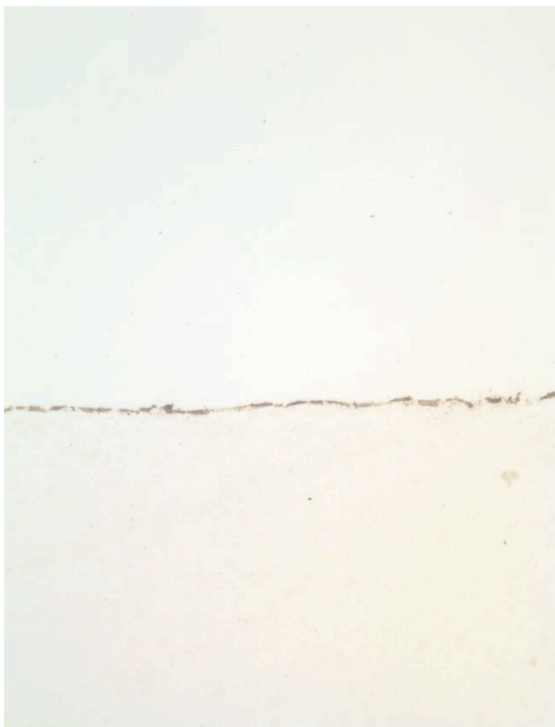
(Abb. XXIV)
Abb. XXIV zeigt den Tag 10 nach Aussaat EC auf der glatten, abgeschabten MC-Oberfläche.

Die Abb. XXIII und XXIV demonstrieren in HE-gefärbten lichtmikroskopischen Aufnahmen die Entwicklung einer Endothelzellkultur auf unbehandelter, rauer und glatter, abgeschabter MC am Tag 10 nach Aussaat am Endpunkt des Versuches. Die Zellkonzentration betrug 12000 Zellen/Well. Vereinzelt sind Zellen zu erkennen, von Konfluenz jedoch weit entfernt. Die Bilder sind in 20facher Vergrößerung aufgenommen.

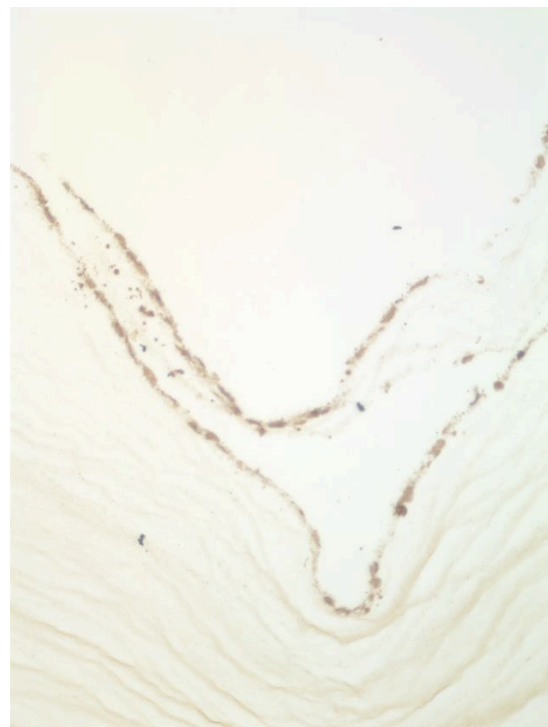
Übersichtsaufnahmen in 100facher Vergrößerung zeigten, dass sich kaum vaskuläre Zellen auf den Plättchenoberflächen fanden. Die MC selbst schien, gerade bei höherer Vergrößerung gut sichtbar, kraterartig aufgerissen und zerklüftet zu sein. Dies sollte auf die Behandlung zur elektronenmikroskopischen Betrachtung zurückzuführen sein. Waren Endothelzellen zu sehen, so schienen sie nur aufzuliegen und ohne feste Verbindung zum Untergrund zu sein. Teils konnten etwa 20µm große Klümpchen auf der MC-Oberfläche ausgemacht werden, wobei es sich bei diesen wahrscheinlich um bereits apoptotische, vaskuläre Zellen handelte. Der Eindruck der Inkompatibilität von vorhandener, angelieferter MC mit HUVEC wurde auch in diesen Aufnahmen bestätigt.

Versuchsbedingungen	Materialien	Zellkulturen	Auswertung
Statisches Besiedeln, 2 Entnahmezeitpunkte, Massenzellzahl, 6-Well-Platte	2 MC-Chargen	2 EC-Kulturen	Lichtmikroskop

Aufgrund der mangelhaften Besiedelungsfähigkeit der EC auf der MC-Oberfläche bei geringer Zellzahl wurde ein weiterer Versuch, nicht wie bisher mit maximal 12000 Zellen/Well, sondern mit einer Zellzahl von 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte durchgeführt. Dies sollte ein massives Zellangebot darstellen, die 6-Well-Platte zusätzlich die Störfunktion durch Randeffekte möglichst kleinhalten. Der Versuch endete nach sieben Tagen. Hier kamen wiederum die histologischen Färbungen mit dem SMC-AK, mit CD31- und vWF-AK zur Auswertung zum Einsatz. Zusätzlich wurde erneut als unspezifischer Antikörper ein Collagen-AK beigebracht. Exemplarisch sollen die Färbungen mit dem vWF-AK gezeigt werden (s. Abb. XXV-XXVI).



(Abb. XXV)
Abb. XXV zeigt Tag 7 nach Aussaat EC auf der vWF-AK-behandelten MC-Oberfläche,



(Abb. XXVI)
Abb. XXVI zeigt Tag 7 nach Aussaat EC auf der vWF-AK-behandelten MC-Oberfläche,

Die Abb. XXV und XXVI zeigen die histologische Auswertung eines Versuches, bei dem 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ sowie 5×10^6 Endothelzellen auf eine MC-Oberfläche ausgebracht wurde. In der obigen Darstellung werden exemplarisch die Färbungen mit dem vWF-Antikörper gezeigt, in der kleinsten und größten Zelldichte. Im unteren Bereich der Bilder ist der angeschnittener Anteil des MC-Plättchens zu sehen, aufgelagert finden sich Zellschichten, die sich vor allem in der Abb. übereinanderliegend zeigen. Von einer festen Verbindung zwischen Zellen und Auflage kann nicht ausgegangen werden. Die lichtmikroskopischen Aunahmen wurden in 10- und 20facher Vergrößerung durchgeführt.

Wiederum konnten nur in kleinen Bereichen des MC-Plättchens Zellabsiedelungen entdeckt werden, große Areale waren unbesetzt, weswegen nur die besiedelten Abschnitte gezeigt werden. Die Zellen schienen im Vergleich zum vorher beschriebenen Versuch ebenfalls nicht fest mit dem Unterboden konnektiert zu sein und lagerten sich, teilweise frei flottierend, übereinander an. Die Tatsache, dass sich die Zellen, wie vorher beschrieben, nach längerer Zeit vom Untergrund abheben, konnte auch in diesem Versuch bereits nach 7 Tagen nachgewiesen werden. Somit konnte auch hier von einer bereits initial fehlenden Verbindung von Endothelzellen mit der MC-Oberfläche ausgegangen werden.

3.2 Besiedelung von schlauchförmiger MC in der Perfusionsanlage

Versuchsbedingungen	Materialien	Zellkulturen	Auswertung
Statisches Besiedeln im Perfusionsmodell, Bioreaktor 1 Entnahmezeitpunkt	1 MC-Charge, schlauchförmig	1 SMC-Kultur	Lichtmikroskop

Die bisher erläuterten Versuche zur statischen Besiedelung haben die grundsätzliche Eignung des Materials Mikrokristalline Zellulose für die Besiedelung mit vaskulären Zellen untersucht. Für die effiziente Herstellung von kleinlumigem Gefäßersatz war es jedoch wesentlich, die Besiedelung von schlauchförmiger mikrokristalliner Zellulose in einem Perfusionsmodell zu demonstrieren.

3.2.1 Äquilibrierung und Besiedelung der MC-Schläuche

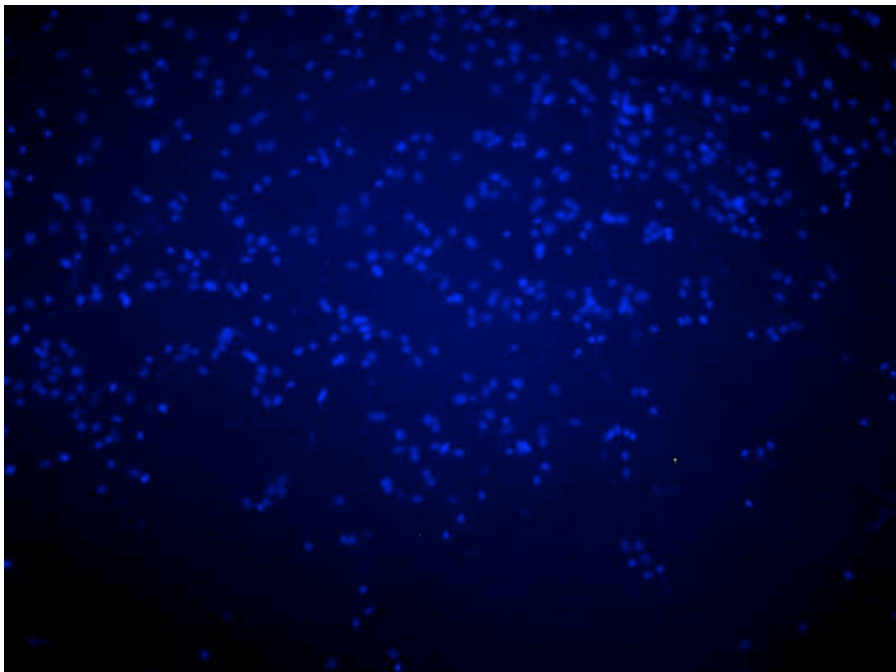
Für die Befestigung von Scaffolds in der Perfusionsanlage stand eine Reihe von Glasröhrchen zur Verfügung, deren Enden jeweils auf einen definierten Durchmesser von 3-6 mm verjüngt waren. Der Hersteller der MC stellte für diesen Versuch eine begrenzte Zahl von Schläuchen aus unterschiedlichen Chargen zur Verfügung, die jeweils mit einem nominalen Innendurchmesser von 3 mm hergestellt waren (Injektion: Kultur 1104p2 AO-SMC, Konzentration $7,6 \times 10^6$ Zellen/ml ungefärbt, Rotation $180^\circ/90^\circ$ für eine Stunde; Probleme beim Drehen: Erste Injektion stehend inkubiert, zweite Injektion durchgeführt, eine Stunde bei 4°C zwischengelagert, Rotation $180^\circ/90^\circ$ für eine Stunde). Es zeigte sich, dass dünnwandige Chargen nicht in ähnlicher Weise wie native Gefäße auf den Glasröhrchen befestigt werden konnten, da das Material kaum elastisch war und die mechanische Belastung bei der Kanülierung Risse verursachte. Die zerstörungsfreie Kanülierung gelang schließlich nur mit einem dickwandigen Präparat. Die anschließende Besiedelung wurde gemäß einem Verfahren durchgeführt, welches zur konfluenten

Besiedelung von endothel-denudierten Nabelschnurvenen entwickelt wurde [Hoenicka et al. 2012].

Die Scaffolds wurden eine Stunde lang unter permanentem Medien-Fluss äquilibriert. Die Besiedelung erfolgte mit einer Kultur aortaler Glattmuskelzellen ($7,6 \times 10^6$ Zellen/ml).

3.2.2 Histologische Beurteilung

Anders als bei den rein statischen Besiedelungsvorgängen der MC-Plättchen konnte hier eine beinahe konfluente Glattmuskelzellschicht in der DAPI-Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. XXVII). Ebenso zeigte sich die Zellschicht nicht lose, frei flottierend oder teilweise übereinandergefaltet, wie es bei den Plättchen beobachtet werden konnte. Vielmehr schien sie eine bessere Adhäsion zur Unterlage gefunden zu haben.



(Abb. XXVII)

Abb. XXVII zeigt mittels DAPI die Zellkerne auf der luminalen Oberfläche eines MC-Schlauches mit 3mm Innendurchmesser nach Besiedelung mit aortalen Glattmuskelzellen, in der gewählten UV-Beleuchtung blau gefärbt. Die mikroskopische Beurteilung der luminalen Oberfläche der besiedelten MC ergab eine annähernd konfluente Besiedelung mit Glattmuskelzellen entlang des gesamten Schlauchumfangs.

4. Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit und wesentliche Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation einer neuartigen mikrokristallinen Zellulose (MC) für die Herstellung von kleinlumigem Gefäßersatz. Mithilfe mehrerer Versuche sollte ein Verfahren entwickelt werden, auf die MC - Oberfläche ein Monolayer aus Endothelzellen auszubringen. Desweiteren folgten Versuche, die in der Zielsetzung die Schaffung eines MC-basierten Gefäßgerüsts, der Morphologie eines menschlichen Blutgefäßes entsprechend, auf eine Schicht aus Glattmuskelzellen sollte ein Endothelzellmonolayer folgen, ausgerufen hatten. Idealerweise wäre eine Produktion extrazellulärer Matrix zu beobachten gewesen. Eine Absiedelung von Endothelzellen (EC) auf der MC konnte nur für die Versuche beobachtet werden, bei denen der Perfusionsbioreaktor, dessen Konzept und Arbeitsweise bei Hoenicka et al. 2010 beschrieben werden, in den Aufbau eingeschlossen wurden. Weitere Ansätze, die Penetration von Glattmuskelzellen in die MC mittels zentrifugaler Beschleunigung zu erreichen, zeigten, dass die Oberflächenbeschaffenheit der MC diesen Versuchsschritt nicht zuließ. Als Hauptergebnis konnte festgestellt werden, dass, trotzdem in der Literatur von Erfolgen in der Besiedelung von mikrokristalliner Zellulose mit EC berichtet wird [Bodin et al. 2007, Fink et al. 2010], die für diese Arbeit verwendete MC nicht die Voraussetzungen liefern konnte, welche zu verwertbaren Ergebnissen in den oben genannten Veröffentlichungen geführt hatten. Dies mag verschiedene Gründe haben, die im Folgenden erläutert werden sollen.

Bezugnehmend auf oben genannte Autoren mag angenommen werden, dass die Herstellung der für diese Arbeit verwendeten MC von den bereits in der Literatur genannten Standards, was die Beschaffenheit der Oberfläche oder die Reinheit des Materials betrifft, abweicht. Dies mag zum einen daran gelegen haben, dass sich der Produktionsprozess noch in der Entwicklung befand, zum anderen daran, dass die zur Verfügung gestellte MC und deren Herstellung proprietär waren und sich der Produzent verständlicherweise nur in unzureichender Form über den Fertigungsprozess äußern wollte. Allerdings wurden wir vom Hersteller der mikrokristalline Zellulose auf folgendes aufmerksam gemacht: Wie auf einigen Bildern (Ergebnisteil) zu sehen, durchziehen fertigungsbedingt myzelartige Strukturen die MC, was sich durch zipfelartige, frei bewegliche Ausläufer an der Oberfläche bemerkbar machte. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass Glattmuskelzellen, wie auch Endothelzellen, keine Verbindung zur Oberfläche finden konnten und so beim Mediumwechsel verloren gingen oder auch durch die Bewegung der frei flottierenden MC-Fädchen in der Anheftung gestört oder wieder abgeschert wurden. Trotz Entfernung der Fädchen mittels Abschaben durch eine Skalpellklinge konnte keine Verbesserung des Ergebnisses erzielt werden. Dies könnte auch an folgenem liegen: Ein Blick in die Literatur zeigt, dass

Materialien, die in mikrobiologischen Prozessen gefertigt werden, durchaus Rückstände von Endotoxinen aufweisen, möglicherweise zurückzuführen auf Restbestände der bakteriellen Zellwand [Petersen et al. 2011]. Das Endotoxinlevel für in Wasser inkubierter Zellulose wurde auf weniger als 0,1 Endotoxineinheiten / ml (EU/ml) festgelegt [Bodin et al. 2010]. Dies mag ein Grund für die ungenügenden Versuchsergebnisse dieser Arbeit gewesen sein. Zudem konnten aufgrund der Limitierungen des Herstellungsprozesses notwendige Änderungen in der MC nicht durchgeführt werden; gewünscht war eine höhere Porosität des Materials mit daraus resultierender verbesserter Eindringtiefe der Zellen.

4.2 Vergleich der MC mit biologischen Prothesen und synthetischen Polymeren

An synthetischen Polymeren für den Gefäßersatz wird mittlerweile seit etwa 50 Jahren geforscht. Reine biologisch-basierte Modelle wie die mikrokristalline Zellulose werden im Rahmen der Gefäßprothesen erst seit einigen Jahren genauer beleuchtet. Kollagen- und Fibrinpolymere, welche eine hohe Biokompatibilität aufweisen, sowie eine Anzahl verschiedenster Erzeugnisse auf Grundlage einer extrazellulären Matrix wurden in ihrer Eignung für den Einsatz als Gefäßersatz untersucht [Campbell et al. 2007]. Als Beispiel kann der Einsatz von Ureteren von Hunden als Gefäßersatz für Carotiden genannt werden [Narita et al. 2008].

Publikationen, die sich mit der Aufbereitung, Besiedelung und verschiedensten mechanischen Testverfahren wie Zugprüfversuchen für den Einsatz von humanen Nabelschnurvenen und Rindervenen (Vv. saphenae) und deren Vorteilen als Gefäßersatz auseinandersetzten [Hoenicka et al. 2007, 2008, 2010, 2011], kommen zum Schluss, dass sich mittels einer sanften, mechanischen Dezellularisierung und einer Neoendothelialisierung im selbst entworfenen und vorgestellten Bioreaktor zukunftssträchtige Gefäßprothesen entwickeln lassen. Ein nachfolgender Versuch dieser Arbeit, der die Besiedelung eines tubulären MC-Gebildes mit Endothelzellen zum Ziel hatte, bezieht sich auf die Erkenntnisse und Vorgaben von Hoenicka et al. 2011. Im klinischen Einsatz befinden sich jedoch im Moment, was die Gefäßsubstitution anbelangt, nur die synthetischen Polymere. Aktuell werden vermehrt expandiertes Polytetrafluorethylen (Teflon), Polyethylenterephthalat (Dacron®) und Polyurethan (PU) als künstlicher Gefäßersatz eingesetzt [Kannan et al. 2005], jedoch, aufgrund im Weiteren beschriebener Ergebnisse, nur peripher und großlumig.

Allerdings haben sich diese Materialien bezüglich Thrombogenität und Performance bei einem Durchmesser von unter 6mm als nicht verwertbar erwiesen, wie sie jedoch für den Ersatz zum Beispiel einer V. saphena, einer A. thoracica interna oder einer A. radialis benötigt werden [Conte 1998, Abbott et al. 1987, Wittemore et al. 1989]. Für den Einsatz von großkalibrigen Gefäßen werden sie jedoch erfolgreich eingesetzt. Die

Hauptursache für das Versagen der Gefäßersatzimplantate ist sicher in der Verursachung von Thromosen bzw. Thromboembolien zu finden, ferner spielen neben Infektionen die intimale fibrosierende Hyperplasie und die schlechte mechanische Performance eine Rolle [Padera et al. 2004].

Diese Probleme rühren auch daher, dass nach beinahe 50 Jahren Forschung bisher kein Material entdeckt wurde, das zuverlässig für einen Einsatz als Gefäßbrücke einsetzbar wäre [Ratner 2007].

Zur besseren Verdeutlichung der unterschiedlichen Ansätze soll nun ein kurzer Vergleich zwischen MC und anderen Gefäßersatzverfahren, wie z.B. ePTFE, erfolgen.

Gemeinhin verwendete Polymere wie Polyglycolsäure (PGA) oder Polylactinsäure (PLA) verhindern sowohl in chemischer als auch in mechanischer Hinsicht die in-vitro-Zellproliferation und induzieren Entzündungsreaktionen [Higgins et al. 2003].

In einer großangelegten, literaturbasierten Querschnittsstudie kommen Zilla et al. 2007 zu dem Ergebnis, dass für die drei gängigsten Implantationsmaterialien ePTFE, Dacron[®] und Polyurethan (PU) im Kleinkaliberbereich nur absolut ungenügende Ergebnisse erreicht werden. Selbst nach verlängerten Zeitintervallen hatte eine persistierende, teils heftige, Antikörperantwort vorgelegen. Zusätzlich hatte sich auf keiner der aktuell klinisch verwendeten Oberflächen Neointima gebildet, von ein paar vereinzelt Flecken Endothels abgesehen. Ebenso hatten sich schon nach kurzer Zeit intraluminal Thrombosen gebildet. Der allergrößte Teil der Gefäßprothesen war so undurchdringlich, dass eine transmurale Gewebseinsprossung unmöglich war.

Johnson et al. 2000 und Xue et al. 2003 konnten nachweisen, dass auch bei den großvolumigeren femoropoplitealen Bypassgefäßen auf ePTFE-Basis nach fünf Jahren nur noch 45% durchgängig waren, wohingegen körpereigene Veneninterponate noch eine Offenheitsrate von 60-80% aufwiesen. Als antithrombotischer Faktor hat sich Heparin im Tissue Engineering einen Platz geschaffen, in seiner Funktion durch die Bindung mit Antithrombin in seiner Potenz vervielfacht. Ein heparinisierendes ePTFE-Gefäßgerüst (Propaten[®]) wurde in den letzten Jahren Ziel einer fünfjährigen Studie [Losel-Sadee und Alefelder 2009]. 75 Patienten wurde, da kein autologes Gefäßmaterial mehr zur Verfügung stand, ein infrageniculärer Bypass implantiert. Eine Offenheitsrate von über 70% konnte auch nach fünf Jahren vermeldet werden.

Zellulosebasierte Materialien erzeugen vernachlässigbare Antikörper- und Entzündungsprozesse und werden demnach als bioverträglich eingestuft [Klemm et al. 2005]. Allerdings ist bekannt, dass Zellulose, eventuell aufgrund von Restbeständen bakterieller Fragmente, zu einer Komplementaktivierung führt [Frank et al. 2001]. Zudem könnten die Hydroxylgruppen, die in der MC exponiert liegen, eine Komplementaktivierung auslösen [Arima et al. 2009, Toda et al. 2008]. Die Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht bekannt und bedürfen weiterer Forschungsanstrengungen. Fink et al. stellten 2010 jedoch fest, dass sich eine in der Literatur beschriebene gesteigerte

Thrombozytenaktivierung bei erhöhter Komplementaktivität im Falle der MC nicht beobachten lässt.

Zu einem erfreulichen Ergebnis hinsichtlich der Bioverträglichkeit von mikrokristalliner Zellulose kommen Helenius et al. 2006. Sie konnten zeigen, dass sich MC gut ins Zielgewebe integrieren ließ und keine Entzündungs- oder Antikörperreaktion auslöste. MC-Stücke wurden subkutan in Ratten implantiert und zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten explantiert und aufgearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration der MC ins Zielgewebe so gut vonstatten ging, dass die Schwierigkeit entstand, die einzelnen Gewebearten klar auseinanderzuhalten. Anstelle der Carotiden von Schweinen implantierten Wippermann et al. 2009 acht unbehandelte Schläuche aus MC mit einem Innendurchmesser von 3,0 bis 3,7mm, die nach drei Monaten noch eine Offenheitsrate von 87,5% aufwiesen, ein Schlauch war aufgrund von Wandinstabilitäten verschlossen. Keine der Prothesen wies eine signifikante Stenose auf, nach 90 Tagen war eine Verringerung des Durchmessers um 0,1mm nachweisbar. Lediglich eine geringe subintimale Hyperplasie konnte beobachtet werden. Eine verstärkte Proliferation von Makrophagen, Lymphozyten oder Granulozyten war in den Bereichen der Neointima und der Media nicht erkennbar.

Im Gegensatz zu PET (Dacron®) - und ePTFE (Teflon) - Schläuchen ist dieses Ergebnis, gerade beim Implantationsausschluss dieser Materialien bei einem Durchmesser von <6mm aufgrund von Antikörperreaktion, thrombosebedingter Okklusion und der generellen Schwierigkeiten dieser synthetisch hergestellten Gefäße [Zilla et al. 2007], ein hervorragendes.

Wie bereits oben angedeutet, verglichen Bäckdahl et al. 2006 die mechanischen Eigenschaften von Ringen aus MC, ePTFE und einer Schweineaorta. Hier wird deutlich, dass die Eigenschaften der MC-Ringe denen der Aorta ähnelten. Im Zugprüfversuch und beim Berstdruck konnte der ePTFE-Ring signifikant höhere Werte erzielen als die beiden anderen. Beim Elongationsversuch konnte die MC ab 35% eine Kraftentwicklung aufweisen, nach der Exposition zeigte diese Probe ein linear elastisches Verhalten. Bei kleiner Kraftentwicklung konnte keine Elastizität beobachtet werden. Das ePTFE zeigte elastische Veränderung bis zu einer Elongation von 55%, was aber dann zu einer irreversiblen Deformation führte. Die Schweineaorta wies ähnliche Verformungseigenschaften auf wie die MC, allerdings benötigte sie für die gleiche Kraftentfaltung eine um 300% stärkere Elongation. Die Verformungstendenz der beiden letztgenannten Ringe ist im Hinblick auf einen Mimikry der mechanischen Eigenschaften vielversprechend, allerdings muss untersucht werden, inwieweit die stark unterschiedliche Elongation redundant ist.

Aufgrund dieser Studienerfolge dürften für die MC sowohl eine gute Bioverträglichkeit als auch ein vielversprechender Ansatz als Implantationsmaterial feststehen.

4.3 Gefäßersatz und Hämostase

4.3.1 Übersicht entscheidender Punkte

Conte gibt 1998 bezüglich eines perfekten Gefäßersatzes folgendes Statement ab: Neben der Biokompatibilität, welche Abstoßungsreaktionen ausschließt, also keinerlei Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe aufweisen dürfte, müsse das Implantationsmaterial ausreichende mechanische Eigenschaften besitzen wie Widerstandskraft, Berstdruckeigenschaft, Compliance und gute Nahteigenschaften. Athrombogenität und Infektionsresistenz müssten ebenso selbstverständlich sein. Weiterhin sollte das Produkt, damit sind wünschenswerte Faktoren beschrieben, geringe Herstellungskosten besitzen und einfach im Gebrauch sein, auch wäre eine differenzierte Auswahl des Fabrikats, was Länge oder Durchmesser angeht, wünschenswert. Um die Wichtigkeit der Athrombogenität genauer zu verstehen, soll ein kurzer Blick auf die Physiologie der Hämostase geworfen werden. Die Entwicklung eines funktionalen, adhärenen Endothels ist einer der Hauptfaktoren, die ein erfolgreiches Entwickeln eines künstlich hergestellten Gefäßersatzes wesentlich beeinflussen [Mitchell et al. 2003].

Als wesentlicher Punkt beim artifiziellen Gefäßersatz bleibt die Vermeidung oder zumindest weitgehende Repression der Thrombogenität bestehen. Diesbezüglich definiert Williams 1999 Thrombogenität als die Fähigkeit eines Materials, die Bildung eines Thromboembolus zu induzieren oder voranzutreiben. Athrombogenes Material sollte nach Sefton et al. [2000] also eine konstante, wenn auch geringe Thrombinproduktion aufweisen, ebenso wenig bis gar keine Thrombozyten verbrauchen und eine niedrige Aktivierungstendenz für ebendiese besitzen. Ergänzend muss für die Arbeit von Sefton et al. erwähnt werden, dass dies nur für Tissue-Engineering-Grafts gilt, da theoretisch auch eine Oberfläche entwickelt werden könnte, die weder thrombogen ist noch die Anlagerung anderweitiger Komponenten, z.B. Komplement, erlaubt und demzufolge auch nicht auf Thrombinsekretion angewiesen wäre. Ebenso wäre generell eine geringe Aktivierung von Komplement und Leukozyten wünschenswert.

Die Koagulationskaskade der Hämostase ist in verschiedene Bereiche aufgeteilt, die primäre und die sekundäre Hämostase sowie den am Ende beider vereinigende Weg mit Faktor X, Thrombin und Fibrin [Jetsy et al. 1995]. In der primären wird, z.B. bei der Verletzung von Endothel und der dadurch bedingten Freisetzung von Kollagen, eine sofortige Bindung an Kollagen durch Thrombozyten durchgesetzt. Verantwortlich hierfür sind Glykoproteine (GP), im speziellen das GPIb-XI-V, das über das Plasmaprotein von-Willebrand-Faktor (vWF), welches sich ebenfalls stark affin zu Kollagen verhält, in der Form unterstützt wird, dass vWF zahlreiche Rezeptoren für GPIb-XI-V offenhält, welche nach der Bindung eine sofortige Signaltransduktion und somit Plättchenaktivierung auslösen.

Die aktivierten Plättchen sorgen über die Expression des Glykoproteins GPIIb/IIIa wiederum selbst für eine verstärkte Anlagerung frei flottierender Plättchen an den bereits bestehenden Thrombus [Fink 2010]. Nebenbei sorgen Plättchenagonisten wie das Thromboxan A₂ (TxA₂) für eine weitere Koagulation und Vasokonstriktion. TxA₂ als Metabolit ist nebenbei über Hemmung des Arachidonsäurezyklus durch Acetylsalicylsäure, z.B. Aspirin®, im Entstehen gehindert, was eine Suppression der Plättchenaggregation wirkungsvoll unter Beweis stellt [Blockmans et al. 1995]. Die sekundäre Hämostase ist in zwei Bereiche aufgeteilt, den intrinsischen (tissue factor pathway) und den extrinsischen (contact activation pathway) Weg. Beide Wege führen auf einen gemeinsamen Pfad, welcher über positive Feedbackschleifen zu massiver Freisetzung von Thrombin führt, welches Fibrinogen zu Fibrin umwandelt und unter gleichzeitiger Anwesenheit von Faktor VIIa, welcher ebenfalls von Thrombin aktiviert wird, ein stabiles Fibrinpolymer herstellt, das in Quervernetzung den initial sog. „weißen“ Thrombus in einen unlöslichen „roten“ Thrombus umwandelt [Boon 1993].

4.3.2 Endothelzellen und ihre Eigenschaften

Direkt mit dem Blut korrespondierend, finden sich Endothelzellen (EC) als innerste Schicht eines Blutgefäßes. Um die Komplexität und Eigenschaften dieser Zellen zu verstehen und sie in den Zusammenhang mit einem voll funktionsfähigen Gefäßersatz zu bringen, sollen die entscheidenden Fakten kurz angerissen werden. Das Endothel, aufliegend auf den Blutgefäßwänden, setzt sich aus einem Plattenepithel zusammen, welcher sich als Monolayer darstellt. Erstaunlicherweise werden die Blutgefäße insgesamt von 350-1000m² EC-Fläche bedeckt und erreichen ein Gesamtgewicht von ½ bis 1 ½ kg [Jaffe 1987, Pries et al. 2000]. Morphologisch sind diese Zellen an einem Pflastersteinmuster zu erkennen, was sich als essentiell für einen strömungsfreien Blutfluss erweist. Neben der Funktion als Barriere vor dem umgebenden Gewebe und dem daraus resultierenden Schutz vor Thromboembolien erweisen sich die Endothelzellen als Modulator in den Bereichen Vasokonstriktion bzw. -dilatation, Anti- bzw. Koagulation oder auch Wachstumsstimulation bzw. -inhibition. Als Beispiel für die Antikoagulation kann Antithrombin III genannt werden, welches Thrombin bindet und so antithrombotisch wirkt, als ein möglicher Gegenspieler tritt vWF auf, der die Plättchenaggregation stimuliert. Über genannte Faktoren regulieren sich Gefäßstruktur, Gefäßtonus, die inflammatorischen und immunologischen Antworten sowie die Hämostase [Fink et al. 2010]. Außerdem sind aktivierte Endothelzellen in der Lage, Wachstumsfaktoren zu synthetisieren und zu sezernieren, welche die Glattmuskelzell (SMC) - proliferation steigern. Interessanterweise tritt subintimale SMC-Proliferation vorzugsweise in den Gebieten auf, welche von Endothel bedeckt sind [Greisler et al. 1996]. Endothelzellen regulieren über den Gefäßtonus auch den lokalen Blutfluss, indem sie eine Kommunikation zwischen dem Blut und den darunterliegenden Glattmuskelzellen ermöglichen. Dies geschieht durch die Produktion von Substanzen, welche einen Einfluss auf die Kontraktion

oder Relaxation der Glattmuskelzellen haben. Als gefäßerweiternde Stoffe können Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder NO (syn. EDRF) genannt werden, wobei NO die zentrale Position zufällt. NO, über die NO-Synthase aus L-Arginin gewonnen, diffundiert in die SMC, in denen es über die Aktivierung der Guanylatzyklase zur Produktion von cGMP kommt, was zur Verringerung des intrazellulären Kalziums und damit zur Muskelrelaxation führt. Kontrahierend wirken z.B. Angiotensin II oder TxA₂, auch Bradykinin, Thrombin oder Serotonin. Diese Substanzen führen über eine Stimulation der Endothelzellen zu einer Prostazyklinfreisetzung. Prostazyklin stimuliert die Adenylatzyklase, welche cAMP in den SMC erhöht. Dies führt zu einer vermehrten Kalziumfreisetzung, was einer Vasodilatation entgegenwirkt [Klinke et al. 2005].

4.4 Diskussion der eigenen Versuche

4.4.1 Beschleunigungsversuch

Bei der Zusammenschau des Zentrifugationsversuches, der sich an die Vorgaben und Ergebnisse von Roh et al. 2007 anlehnte, konnte festgestellt werden, dass auch bei erhöhter Geschwindigkeit keine verstärkte Eindringtiefe ins Material erreicht werden konnte. Der Grund hierfür mag sein, dass das bei Roh verwendete Material, eine Unterlage aus Polyglycolsäure (PGA), welches am Ende der Behandlung 1,5mm dick war und eine 90%ige Porösität aufwies, für die Anhaftung der Zellen besser geeignet war als die für diesen Versuch verwendete MC. Bei Roh zeigte sich, dass bei statischem Besiedeln nur eine minimale Penetration der Unterlage erreicht werden konnte; dies konnte auch beim hier zu betrachtenden Versuch nicht beobachtet werden. Bei der Beschleunigung durch Rotation jedoch erzielte er eine um 38% vermehrte Adhäsion der Zellen und eine Zunahme der Eindringtiefe, welche durch das gesamte Material hindurch erfolgte. Zudem konnte eine um 15% gesteigerte Produktion von Kollagen im Vergleich zum statischen Besiedeln erreicht werden. Roh et al. orientierten sich an den Versuchen von Godbey et al. von 2004. Diese Versuchsgruppe verwendete ebenso ein PGA-Gerüst mit einer Dicke von 2,5mm und einem Porositätsgrad von 95%. Seine verwendete Zellpopulation rekrutierte sich aus den Glattmuskelzellen der humanen Harnblase. Godbey et al. erreichten ebenfalls überzeugende Ergebnisse und stellten zusätzlich fest, dass sich eine Reduktion der Geschwindigkeit und der Zellzahl positiv auf das Ergebnis auswirkt. Ng et al. verwendeten 2010 in einem Rotationsversuch humane Kolonkarzinomzellen vom Typ HT-29 sowie das Material Polyethylenterephthalat (PET), welches eine ähnliche Konstellation aufwies wie das Material von Roh et al. 2007, nämlich einen Durchmesser von etwa 8mm und eine Porösität von 89%. Ng et al. erreichten ebenfalls eine hohe Durchdringung des Materials von 90% am Ende des Versuchs, sie kamen zusätzlich zum Ergebnis, dass eine Erhöhung der Beschleunigung eine Verminderung des Verbleibs der Zellen im Gerüst nach sich zieht.

Weiterhin konnte er nachweisen, dass sich bei hoher Zellzahl das Gerüst schneller mit Zellen sättigt, im Verlauf jedoch bei niedriger Zellzahl eine höhere Sättigung erreicht werden kann, da das Durchwandern der Zellen durch die Matrix bei hoher Zellzahl schneller geschieht. Im hier durchgeführten Versuch konnte zwar bei erhöhter Rotorumdrehung (294g) auch eine höhere Zelldichte auf dem MC-Plättchen nachgewiesen werden, allerdings fand sich auch ein nicht unerheblicher Zellbestandteil an Polystyrolwand und -boden. Bei weiter gesteigerter Umdrehungszahl der Zentrifuge (662g) konnte im MTS-Test eine Verringerung der Werte und der daraus resultierenden Zellpopulation nachgewiesen werden. Die Wertminderung zwischen 294g und 662g könnte darin begründet sein, dass mehr Zellen auf der MC zu liegen gekommen waren, diese aber aufgrund der enormen Krafteinwirkung nicht mehr lebensfähig waren. Für diese Annahme spricht, dass der für lebende Zellen konzipierte MTS-Proliferationsversuch keine verwertbaren Ergebnisse liefern. Ebenso stellt sich die Frage, ob PS im Gegensatz zu MC für Glattmuskelzellen das attraktivere Material zur Adhäsion darstellt. Ein Blick auf die in dieser Arbeit ebenfalls beschriebene, deutlich stärkere Affinität der EC zu Polystyrol als zu MC zeigt, dass dieses Ergebnis noch untermauert werden könnte, wenn davon ausgegangen wird, dass die Geschwindigkeit der Rotation das Überleben der Zellpopulation nicht antastet, denn die von Roh eingestellte Beschleunigung (847g) überstieg die hier verwendete Geschwindigkeit deutlich. Die Rotordurchmesser in den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen waren im Vergleich zu denen bei Roh et al. 2007 ähnlich, was die vergleichende Betrachtung anhand der Umdrehungszahl des Rotors zulässt. Jedoch muss der Unterschied in der verwendeten Zellart berücksichtigt werden, bei Roh wurden mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark verwendet, hier kamen HUVEC zum Einsatz; dies mag die Argumentationskraft bezüglich der Überlebensfähigkeit der Endothelzellen auch bei hoher Beschleunigung möglicherweise schwächen. Ng verwendete ähnlich hohe Beschleunigungen, wie sie im hier aufgeführten Versuch eingestellt wurden. Der Schlüssel zu einem erfolgreichen Versuch mit MC scheint wohl in der Kombination von hoher Affinität der Zellen an das Trägergerüst, von hoher Porosität des Materials selbst, bei gleichzeitig vorhandener ausreichender Zugfestigkeit und stabiler Berstdrucksituation, und der Vermeidung zu hoher Zellzahlen und Geschwindigkeiten zu liegen. Eine Besiedelung in der Perfusionsanlage könnte eine Alternative zur Zentrifuge sein, gerade, wenn man die Besiedelung von Schläuchen zum Ziel hat. Ein späterer Abschnitt wird sich noch mit dieser Möglichkeit beschäftigen.

4.4.2 EC-Besiedelung mit/ohne Gelatine, Fibronektin und BME

Anders als bei synthetisch hergestellten Gefäßprothesen, z.B. ePTFE oder Dacron[®], auf denen sich vergleichsweise leichter Endothelzellen anlagern und haften, scheint bei den Besiedelungsversuchen von Endothelzellen auf MC eine Oberflächenmodifikation einen deutlichen Vorteil zu bringen [Bodin et al. 2007, Fink et al. 2010]. Zudem wird die Zugabe von

adhäsionsfördernden Stoffen wie Fibronectin oder Laminin diskutiert [Lavender et al. 2005, Seeger und Klingman 1988]. Lavender et al. kommen zu dem Ergebnis, dass eine Zugabe von Fibronectin und Laminin zu einer vermehrten Absiedelung von Endothelzellen im Vergleich zu unbehandeltem Material, allerdings auf eine SMC-Unterlage, führt. Seeger und Klingman beobachten 1988, dass sich bei Zugabe von Fibronectin eine verbesserte Endothelialisierung von synthetisch hergestellten Gefäßprothesen erreichen lässt.

Fink et al. 2010 kommen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass bei der Modifikation der MC mit Xyloglukan, welches als Carriermolekül bereits von Brumer et al. 2004 und Zhou et al. 2007 vorgestellt wird, die Struktur der Zellulose nicht verändert wird und eine chemische Behandlung mit nachfolgender Veränderung der Morphologie unterbleiben kann [Bodin et al. 2007], und in der Verknüpfung mit RGD (Arg-Gly-Asp) als Adhäsionspeptid Beeindruckendes liefern kann. Bartouilh de Taillac et al. erreichten 2004 eine um 20% erhöhte Anlagerung von Osteoprogenitorzellen auf MC alleine durch Einführung dieses Peptids, Fink et al. kamen 2010 auf ein vergleichbares Ergebnis durch die Einführung der RGD-modifizierten MC. Durch diese Modifikation konnte eine vermehrte Zellstreuung samt einer erhöhten Stressfaserformation erreicht werden, welche sich in vivo für die Zelladhäsion als wichtig erweist. Ebenso konnte durch Hinzunahme des RGD-Peptids ein bevorzugtes Absiedeln von Endothelzellgruppen beobachtet werden, was als Schritt in Richtung einer konfluenten Endothelzellschicht gewertet wird.

In dieser Arbeit wurde ein Versuch durchgeführt, der die Besiedelung von Endothelzellen auf MC unter Zuhilfenahme von Fibronectin, BME und Gelatine ermöglichen sollte. Gelatine, so hatten Vorversuche gezeigt, brachte für die Zellabsiedelung auf MC keinen Vorteil, eher konnte der gegenteilige Effekt beobachtet werden, bei der Besiedelung von synthetisch hergestellten Oberflächen wie Polystyrol hingegen zeigte sich die Gelatine für die Adhäsion der Endothelzellen durchaus wichtig. BME (basement membrane extract) ist als Substanzgemisch, welches aus der Basalmembran isoliert wird, ein adhäsionsfördernder Stoff, der viele Proteine der extrazellulären Matrix, welche dort angelagert sind, z.B. Fibronectin und Laminin, enthält. [Kubota et al. 1988]

Auch für diesen Versuch konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden, was vor allem an der MC zu liegen schien. Daher scheint der bei Bodin et al. 2007 und Fink et al. 2010 beschriebene Weg der Oberflächenmodifikation erfolgversprechender.

4.4.3 SMC- / EC- Besiedelung

Statisches Besiedeln, bei dem sich eine konzentrierte Zellsuspension in passiver Weise auf ein Gewebe absetzen soll, ist die am meisten verwendete Zellbesiedelungstechnik des Tissue Engineering [Roh et al. 2007].

Einige Systeme zur Beobachtung von EC-SMC-Interaktionen werden in der Literatur erwähnt, zum Beispiel beschreiben van Buul-Wortelboer et al.

1986 und Ziegler et al. 1995 bereits die Beobachtungen von EC- und SMC-Kokulturen, und zwar in dem Modell, dass Endothelzellen auf eine Kollagenunterlage, die SMC enthält, aufgetragen werden. Zusätzlich konnten Ziegler et al. noch zeigen, dass sich Endothelzellen unter statischen Bedingungen elongiert, jedoch ohne zielgerichtete Verteilung, präsentierten, jedoch unter Perfusion sich in den Strom ausrichteten und organisierten. Van Buul-Wortelboer et al. entdeckten, dass sich die Wachstumsrate von SMC in Anwesenheit von EC niedriger darstellt als die der SMC, die in der Kollagenunterlage in der Abwesenheit von EC proliferierten.

Niwa et al. 2004 beschreiben die Kultivierung von EC direkt auf SMC. Diese Gruppe untersuchte die unterschiedliche Aufnahme des low-density-Lipoproteins (LDL) für EC-Monokulturen und eine SMC-EC-Kokultur. LDL gilt als einer der wesentlichen Verursacher der Arteriosklerose [Nielsen 1996]. Niwa et al. konnten beobachten, dass unter niedrigen Flussbedingungen und geringen Scherkräften eine erhöhte LDL-Aufnahme zu verzeichnen ist. Die LDL-Aufnahme (acetyliert) findet über Endothelzellen statt, ist also laut den Autoren für die Mono- als auch die Kokultur gleich. Lediglich bei unbehandeltem LDL konnte eine gesteigerte Aufnahme für die Kokultur gemessen werden, was für den erheblichen Einfluss der SMC spricht.

Fillinger et al. stellen 1995 fest, dass sich eine Kokultur von EC und SMC, jeweils gegenüberliegend auf einer zwischenliegenden dünnen Membran, positiv auf die SMC-Proliferation auswirkt; in dem Modell konnten die SMC über kleine Poren in der Membran mit den EC kontaktieren, obwohl, wie van Kempen und Jongsma 1999 feststellten, ein relativ großer Spalt von 10-50µm zwischen beiden Zelllinien bestehen kann, was leider eine Reduktion von Gap Junctions, welche normalerweise dort bestehen, zur Folge hat. Bezüglich der Tight Junctions konnten Korff et al. 2001 eine Zunahme bei EC-SMC-Kokulturen im Vergleich zu EC-Monokulturen publizieren.

Heydarkhan-Hagvall et al. beobachteten 2003, dass die SMC einer Kokultur (=SMC+EC) signifikant mehr VEGF, PDGF und TGF-β produzieren als in Monokultur. Bei den Endothelzellen bestehen bezüglich der Genexpression der Proteine PDGF und TGF-β keine Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur, jedoch findet sich ein signifikant höherer Wert bei der VEGF-Expression, was zum Schluss führt, dass sich eine Kokultur von SMC und EC positiv auf eine Angiogenese auswirken könnte.

Trotz ebenbeschriebener zahlreicher Ansätze kommen Lavender et al. 2005 zu dem Schluss, dass es bisher wenig Anstrengungen gab, um die Kulturbedingungen zu optimieren und den Einfluss der Endothelzellen, der als wesentlich für die Entwicklung eines funktionsfähigen künstlichen Gefäßersatzes gilt, zu stärken. Ferner äußert sich diese Gruppe dazu, dass sich ein System etablieren müsse, um beide Zelllinien näher in Kontakt zu bringen. Als wesentlicher Punkt in der Studie von Lavender et al. stellte sich heraus, dass sich EC vorzugsweise auf bereits ruhenden SMC anlagerten und nicht auf proliferierenden Zellen, was dem normalen physiologischen Standard entspricht. Als Unterlage wurde Polystyrol gewählt. Ein Wachstum der SMC über die EC-Schicht konnte nicht

beobachtet werden. Allerdings wurde eine niedrige Proliferationsrate sowohl für SMC als auch für EC beobachtet.

Basierend auf Literaturangaben ist die Aktivierung von Transforming Growth Factor- β (TGF- β), welcher die Zellentwicklung von EC verlangsamt bzw. deren Zellbewegung verhindert [Sato und Rifkin 1999], ein möglicher, jedoch auch entscheidender Mechanismus für die unterschiedliche Entwicklung von EC auf proliferierenden bzw. ruhenden SMC. Majesky et al. publizieren 1991 eine niedrige TGF- β -Produktion von ruhenden SMC.

Sogar die Zugabe von endothelzellspezifischem Medium zu oder die EC-Kokultur mit SMC resultieren laut des Reviews von Sporn et al., die im Werk von Gleizes et al. 1997 erscheint, in einer Aktivierung von TGF- β , welches sich als starker Inhibitor einer Zellproliferation ausweist, wie dem Review von Schuster und Krieglstein im Werk von Sporn et al. 1987 zu entnehmen ist. Weiterführend kommen Schuster und Krieglstein 2002 zum Ergebnis, dass TGF- β zusätzlich apoptosefördernd wirkt, und zwar für viele Zellen bei in-vitro-Versuchen, eingeschlossen EC. Lavender et al. konnten noch zeigen, dass im Gegensatz zu proliferierenden SMC, wo eine signifikante Zellzahlminderung festzustellen war, für EC auf ruhenden SMC ein Wachstum festgestellt werden konnte. Weiter wird der Einfluss von konnektionsfördernden Substanzen wie Fibronectin, Laminin, Kollagen I und IV untersucht. Während hingegen Kollagen I und IV keinen adhäsionsfördernden Einfluss der EC auf die SMC hatten, wurde sowohl für Fibronectin als auch Laminin ein leichter positiver Effekt von etwa 10% erreicht. Hinsichtlich der Medienzusammensetzung konnten Lavender et al. feststellen, dass eine Serumkonzentration von 3,3% für eine EC-Anlagerung und -Bindung ausreichend war und zusätzlich die Proliferation der SMC unterdrückte.

Möglicherweise war der für diese Arbeit durchgeführte Versuch aufgrund des nicht ausgereiften Materials, Bäckdahl et al. 2006 konnten ebenso einen signifikant höheren Anteil von Zellwachstum und Adhäsion bei Polystyrol als bei MC für SMC nachweisen, der falsch zusammengestellten Medienkomposition und daraus resultierenden SMC-Proliferation mit anschließender TGF- β -Produktion und nachfolgender EC-Suppression [Lavender et al. 2005] zum Scheitern verurteilt.

4.4.4 Perfusionsversuch

Das eigentliche Ziel der Arbeit, die Besiedelung von schlauchförmiger MC, soll in diesem Versuch noch einmal kurz erklärt und diskutiert werden. Die Besiedelung für den Versuch dieser Arbeit erfolgte mit einer Kultur aortaler Glattmuskelzellen. Nachdem die Zellsuspension eine Stunde lang in der sich drehenden MC inkubiert worden war, wurde frisches Medium zur Reinigung und Versorgung durchgeleitet. Die eigens gefertigte Perfusionsanlage, die bei Hönicka et al. 2010 zur Besiedelung von Vv. saphenae von Rindern verwendet wird, stand für diesen Versuch ebenfalls zur Verfügung. Für die Optimierung eines Reaktors sehen Garcia-Ochoa und Gomez 2008 die Wichtigkeit, Elektrolyteinfluss oder

Sauerstoffverbrauch zu untersuchen. Im Vergleich zu avaskulärem Gewebe wie Knorpel zeigt die Geometrie der Blutgefäße nämlich per se hervorragende Gegebenheiten für eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Hieraus resultiert eine Verkürzung der Diffusionsstrecke zur Nährstoffsupplementierung auf einen Millimeter oder weniger [Wiedemann 2010]. Im Anschluss an die Besiedelung folgte eine DAPI-Färbung zur histologischen Beurteilung, welche, anders als bei den rein statischen Besiedelungsvorgängen der MC-Plättchen, hier eine beinahe konfluente Glattmuskelzellschicht in der DAPI-Färbung nachwies. In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich die Zellschicht nicht lose oder frei flottierend und teilweise übereinandergefaltet, wie es bei den MC-Plättchen beobachtet werden konnte, sondern sie schien eine bessere Adhäsion zur Unterlage gefunden zu haben. Obwohl die Besiedelungszeit in der Perfusionsanlage sehr kurz war und deswegen nicht von einem signifikanten Wachstum ausgegangen werden kann, ist doch in der Literatur zu finden, dass für einen ständigen, pulsatilen Fluss ein signifikant höheres Zellwachstum für HUVEC in 3D-Kulturen mit hoher Zelldichte als unter statischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte [Chouinard et al. 2009]. Weiterhin wurden bei Hoenicka et al. 2010, ebenso wie in dieser Arbeit, alle Versuche unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung durchgeführt, da Izzotti et al. 2008 eine unerwünschte Auswirkung dessen auf die Beschaffenheit der DNA nachweisen konnten. Ähnliche Ergebnisse konnten Morimoto et al. 2003 berichten, die einen Kontraktilitätsverlust bei Rattenarterien im Rahmen eines UV-Licht-induzierten Glattmuskelzelluntergangs nachwiesen. Diese Ergebnisse scheinen logisch, da die menschlichen Gefäße der direkten Sonneneinstrahlung nicht ausgesetzt sind. Wie bereits erwähnt, zeigte sich jedoch in Vorversuchen, dass SMC eher auf der Oberfläche der für diese Arbeit zur Verfügung gestellten MC Haftung fanden als EC. Interessanterweise erreichten Hoenicka et al. 2010 durch Superfusion der Gefäße zusätzlich zur kontinuierlichen Perfusion ein bei Engbers-Buijtenhuijs et al. 2006 beschriebenes permanentes Stoffangebot und die Möglichkeit zum Stoffaustausch.

4.5 Verbesserungsmöglichkeiten

4.5.1 Thromboseprophylaxe durch Oberflächenmodifikation

Wie man sieht, ist die Vermeidung der Thrombogenität von substantieller Wichtigkeit. Bei Langzeitimplantaten wie Bypassgefäßen, künstlichen Herzklappen oder auch Stents scheint eben genanntes absolut relevant zu sein, genauso zutreffend sollte dies bei extrakorporalen Systemen, z.B. einer simplen Blutuntersuchung oder einer Hämodialyse, sein. Prinzipiell scheint jede künstliche Oberfläche geeignet, eine Koagulation zu provozieren, was in der Folge eine Thrombose als Konsequenz mit sich bringt [Fink et al. 2010]. Dies mündet in der Konsequenz, dass die Prävention dieser Komplikationen nur mit teils massiver antikoagulativer

bzw. antithrombotischer Medikation erfolgen kann. Hierbei werden meist hochdosiert Heparine, z.B. während einer coronaren Bypassoperation, eingesetzt, bei der Implantation von Gefäßstents kommt im Anschluss antithrombotische Therapie zum Einsatz, ebenso werden Vit.K-Antagonisten nach der Implantation künstlicher Herzklappen rezeptiert [Koster et al. 2002, Pibarot und Dumesnil 2009]. Allerdings wird damit die Gefahr einer unkontrollierten Blutung erkaufte. Die Beschaffenheit des Materials ist also eng verknüpft mit der Induktion einer Koagulation. Gorbet et al. 2004 und Sefton et al. 2001 fanden heraus, dass durch eine Modifizierung der Oberfläche eine Verringerung der Thrombogenität erreicht werden kann. Nach Fink et al. 2010 stellen die beiden nun vorgestellten Techniken die am vielversprechendsten Herangehensweisen dar: Zum Beispiel bindet mit der Heparinbeschichtung von Corline® ein makromolekulares Heparinkonjugat kovalent an Glas, Metall und Polymerkunststoffe. Seit 1998 im klinischen Einsatz, ist neben einer verminderten Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems auch eine minimale Anlagerung und Aktivierung sowohl von Thrombozyten als auch von Granulozyten zu beobachten [Andersson et al. 2003, Abler 2002]. Ähnlich ist die Carmeda®-Technik zu sehen. Hier ist ebenfalls eine heparinbasierte Oberflächenmodifikation Ausgangspunkt einer Verbesserung der Hämokompatibilität für Systeme, die in Kontakt mit Blut kommen [Riesenfeld et al.1995].

Herring et al. konnten 1978 erstmalig Endothelzellen eines Kaninchens isolieren und sie auf ein künstliches Dacron®-Gefäß aufbringen. Nach Reimplantation konnten sie eine Offenheitsrate von 76% feststellen. Auch andere Wege wie die Behandlung der Oberfläche mit PEG [Fushimi et al. 1998] oder Albumin [Kottke-Marchant et al. 1989] wurden besprochen. Lim et al. behandelten 2008 die Oberfläche eines Polyurethanfilms mit mikrowelleninduziertem Argonplasma. Kovalent gebundenes Heparin an der Materialoberfläche hat mittlerweile seinen Einzug in die Klinik gefunden, da es die erfolgversprechendste Modifikation zur Verringerung der Thrombosierung darstellt [Fink et al. 2010]. Eine weitere erfolgversprechende Strategie war die Einführung des adhäsionsfördernden RGD-Peptids durch Massia und Hubbell 1990, deren Erkenntnis sich später Bodin et al. 2007 und Andrade et al. 2011 in einem nachfolgend vorgestellten Versuch mit mikrokristalliner Zellulose bedienten. Aufgrund nicht allzu vielversprechender Ergebnisse konnte die Besiedlung künstlicher Gefäßgerüste mit Endothelzellen noch keinen Durchbruch im klinischen Bereich erzielen. Trotz aller vorgestellten Herangehensweisen, die zu einer Reduktion der Thrombogenität führten, konnte die Verträglichkeit zwischen dem Umgebungsgewebe und dem teils unflexiblen Material nicht überzeugen [Abbott et al. 1987].

4.5.2 Verbesserung der EC-Adhäsion durch MC-Modifikation

Schon seit längerem wurde mehrfach die Bearbeitung und Verbesserung des Materials mikrokristalline Zellulose angegangen. Serafica et al. veröffentlichten 2002 die Studie, solide Partikel wie Aluminium, Eisen oder Silikon in die MC-Kultur einzubauen. Die Formation der MC änderte sich

während des Versuches nicht. Die Partikel wurden nicht entfernt, um die dadurch veränderten Eigenschaften genauer bestimmen zu können. Im Vergleich dazu wurde bei dem Versuch, den Bäckdahl et al. 2008 publizierten, die dort verwendeten Partikel, nämlich Teilchen aus Kartoffelstärke und Paraffinwachskügelchen, wieder ausgewaschen, um so eine porösere Grundstruktur der MC zu erreichen. Paraffin wurde auch von Ma et al. 2001 verwendet, auf den sich Bäckdahl bezüglich der Paraffinbehandlung bezieht. Zudem wurde mit Salz [Mikos et al. 1994], Eis [Chen et al. 2001], Gelatine [Zhou et al. 2005] und Zucker [Capes et al. 2005] experimentiert. Eine weitere erfolgversprechende Strategie war die Einführung des adhäsionsfördernden RGD-Peptids durch Massia und Hubbell 1990, deren Erkenntnis sich später Bodin et al. 2007 und Andrade et al. 2011 bedienten. Massia und Hubbell gelang es 1990 erstmalig, das adhäsionsfördernde RGD-Peptid in ihr untersuchtes Material einzubauen. Das Ziel der Studie Bodins war, die Oberfläche der MC mit Xyloglucan-GRGDS (XG-GRGDS) zu konjugieren. Xyloglykan wurde aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zu Zellulose verwendet, welche in einer starken Bindung und einer Quervernetzung der Fibrillen mündet [Hanus und Mazeau 2006]. Der Vorteil der Modifikationstechnik mit Xyloglucan liegt in der Wasserlöslichkeit, welche Zellulose nicht bietet, und kann in einem einschrittigen Verfahren integriert werden [Fink et al. 2010]. Diese Aminosäuresequenz sollte, indem wasserbasierte chemoenzymatische Techniken zur Oberflächenbehandlung der Zellulose eingesetzt wurden, in Kombination mit der Ausnutzung der wohlbekanntesten Eigenschaft der EC, sich an Peptide zu binden, die das RGD-Epitop tragen, welches Zellanhaftung und -proliferation fördert, integriert werden [Brumer et al. 2004, Zhou et al. 2006].

Zudem befanden sich als Vergleichsgruppe noch eine XG-behandelte und eine unbehandelte MC-Variante im Versuch. Bodin et al. konnten zeigen, dass sich auf der RGD-behandelten MC-Oberfläche signifikant mehr Zellen absetzten als bei den anderen beiden Gruppen. Die XG-behandelte Gruppe schnitt am schlechtesten ab.

Auf nachfolgend vorgestellter Publikation beruhten Vorversuche zu einem später durchgeführten Assay, der das Ziel hatte, auf eine Unterlage aus SMC Endothelzellen auszubringen. Bäckdahl et al. widmeten sich 2006 der Frage der Interaktion von Glattmuskelzellen mit MC; der andere Teil der Arbeit, der Vergleich von MC zu ePTFE wird im weiteren Verlauf dargestellt. Wie auch in dieser Arbeit festgestellt wurde, konnten Bäckdahl et al. einen signifikant höheren Anteil von Zellwachstum und Adhäsion bei Polystyrol als bei MC nachweisen. Interessanterweise unterscheidet sich die Adhäsionsfähigkeit der SMC an die Oberfläche des Plättchens, die sich porös darstellt, nicht von der Unterseite, die eher fest und solide ist, die Kurven überlappen in der graphischen Darstellung. Ebenso blieb die Morphologie nahezu gleich, die Zellen der soliden Unterseite schienen der Gruppe aber eher flach und dünn, während die SMC der porösen Oberfläche eher kugelig und rund wirkten. Allerdings stellen Bäckdahl et al. fest, dass im Gegensatz zur soliden Unterseite auf der porösen Oberseite ein Eindringen der Zellen ins Material erreicht werden konnte.

Bäckdahl et al. sehen auch ein Potential in der Weiterentwicklung der dem Blut zugewandten Seite in dem Sinne, als eine Endothelzellschicht die Eigenschaften des Materials noch weiter verbessern könnte.

4.5.3 Verbesserung der Endothelialisierung durch Besiedelung im Perfusionsbioreaktor

Hämodynamische Kräfte sind in ihrer Bedeutung für die Gefäßkonditionierung seit langem bekannt [Heinle et al. 1984, Dewey et al. 1981, Kakisis et al. 2004]. Wiedemann bemerkt 2010, dass bei der Vielfalt der Anlagenanwendungsmöglichkeiten eine hohe Flexibilität vonnöten ist, da für die Gefäßkonditionierung und -herstellung eine in ihrer Komplexität teils stark variierende Hämodynamik berücksichtigt werden muss. Dunkern et al. 1999, Rademacher et al. 2001 und Opitz et al. 2004 konnten Zellen, die sich in der statischen Umgebung einer Zellkultur befanden, in dynamischer Weise an physiologische Gegebenheiten anpassen, indem sie die Blutgefäße ansteigenden Perfusionsflüssen und -drücken aussetzten.

Der Versuch der Besiedelung von MC-Schläuchen brachte für diese Arbeit erstmalig verwertbare Ergebnisse. Wie bereits oben geschildert, fanden Chouinard et al. 2009 heraus, dass für einen ständigen, pulsatilen Fluss im 3D - Modell ein signifikant höheres Zellwachstum als unter statischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte.

Eine Proliferationszunahme von Endothelzellen durch erhöhte Scherkräfte konnte von Riha et al. 2005 und Hoenig et al. 2006 beobachtet werden. Hohe bzw. niedrige Scherkräfte scheinen sich in jedem Fall auf die Endothelbeschaffenheit auszuwirken [Vyalow et al. 1996], zu niedrige Flussraten wirken sogar apoptosefördernd [Cho et al. 1997]. Als weitere wichtige Eigenschaft für die Eignung eines Bioreaktors zur Gefäßherstellung wird von Nasserri et al. 2003 und von Zhao und Ma 2005 die Möglichkeit einer langen Inkubationszeit erkannt.

Wie schon weiter oben beschrieben, kommt dem Endothel im Rahmen der Blutgefäßgeometrie und -physiologie also die zentrale Rolle zu. Glacken et al. 1983 und 1986 interessieren sich, wie auch Garcia-Ochoa und Gomez 2008, zum Beispiel für die Punkte Elektrolyteinfluss oder Sauerstoffverbrauch, die sie für die Optimierung eines Reaktors als wichtig erachten. Wiedemann erklärt sich die Vernachlässigung dieser Faktoren für das Tissue Engineering darin, dass die Geometrie der Blutgefäße, im Vergleich zu avaskulärem Gewebe wie Knorpel, per se hervorragende Gegebenheiten für eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung darstellt. Hieraus resultiert eine Verkürzung der Diffusionsstrecke zur Nährstoffsupplementierung auf einen Millimeter oder weniger. Als kritischen Punkt beschreiben Hogg et al. 1999 die Sauerstoffversorgung bei der Gefäßkultivierung, als ausreichend wird bei Hellstrand et al. 1977 ein Partialdruck von 150 mmHg beschrieben. Hoenicka et al. erreichten 2010 durch Superfusion der Gefäße zusätzlich zur kontinuierlichen Perfusion ein bei Engbers-Buijtenhuijs et al. 2006 beschriebenes permanentes Stoffangebot und die Möglichkeit zum Stoffaustausch.

Wiedemann stellt 2010 die Frage nach einer ökonomischen Züchtung durch geringeren Nährmediumbedarf, wenn sich herausstellte, dass Blutgefäße im aeroben Status versorgt werden könnten.

Weitere erwähnenswerte Beobachtungen sind in den negativen Einflüssen hyperkalzämischer und -kaliämischer Suspensionen auf unterschiedliche Zellfunktionen zu finden, wie sie zum Beispiel von Olinger et al 1983, He und Yang 1997 oder auch Jakobsen et al. 2007 und 2008 beschrieben werden.

In der Literatur herrscht bezüglich der Auswirkung von Scherkräften auf Endothelzellen keine eindeutige Übereinstimmung, vermutlich aufgrund sehr stark variierender Versuchsaufbauten. In der Zusammenschau der für diesen Versuch verwendeten Literatur und unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieses Versuches scheint sich ein Volumenfluss mit den daraus resultierenden Scherkräften nicht unmittelbar und für alle Fälle positiv für eine Besiedelung von Blutgefäßen bzw. Gefäßgerüsten auszuwirken, ein vergleichbares Resultat der Besiedelung scheint auch bei ähnlichen Scherkräften nicht gegeben.

In Kenntnis dieser Zusammenhänge wären die nächsten logischen Schritte zur Evaluierung von mikrokristalliner Zellulose als Trägermaterial für kleinlumigen Gefäßersatz die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Druck- und Scherkraftbedingungen auf die Funktion und Stabilität der Endothelzellen sowie der Vergleich mit Gefäßersatz, bei dem zunächst, wie schon bei der statischen Besiedelung gezeigt, eine Trägerschicht aus Glattmuskelzellen bzw. Fibroblasten aufgebracht wird und anschließend endothelialisiert wird. Erst diese Untersuchungen können ein klares Bild darüber ergeben, wie strömungsresistent und entwicklungsfähig die aufgetragenen Zellschichten auf dem Trägermaterial Zellulose sind.

5. Schlussbetrachtung

Für erfolgreiche Experimente mit MC scheinen folgende Voraussetzungen unabdingbar zu sein: Einerseits müssen sich die Zellen hochgradig affin zu einem möglichst porösen und damit haftungsfördernden Trägergerüst zeigen. Andererseits müssen ausreichende Zugfestigkeit und Berstdruckstabilität des Materials gegeben sein. Eine Vermeidung übermäßig hoher Zellzahlen und Besiedelungsgeschwindigkeiten sollten beachtet werden.

Vor allem die in dieser Arbeit angewandte Besiedelungstechnik mithilfe des Perfusions- und Superfusionssystems könnte eine mögliche Methode bieten, den Bereich der Tissue-Engineering-basierten Blutgefäßerstellung auf MC-Basis weiter auszubauen und die Forschung in dieser Hinsicht weiter voranzubringen.

Gerade im Bereich der Chirurgie kleiner Herzgefäße könnte eine Besiedelung von geeignetem MC-Material mit Glattmuskelzellen zu einem neuen Forschungsanlauf führen: Die in das poröse Material eingewanderten Glattmuskelzellen produzieren eine kollagene Matrix und Oberfläche in der Form, dass eine Absiedelung von Endothelzellen und somit eine konfluente Monolayerbildung möglich wird.

Diese Konfiguration muss weiterhin eingehend auf wesentliche Eigenschaften wie Thrombogenität, Berstdruckstabilität, Zugfestigkeit und Verträglichkeit mit dem umliegenden Gewebe untersucht und in diesen Bereichen optimiert werden.

Weitere Versuchsanordnungen in dieser Richtung können letztendlich dazu beitragen, dass die MC als praktikable und zuträgliche Alternative zu körpereigenem Material eingesetzt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF (1987): Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg.* 5(2): p. 376-82

Abler (2002): Untersuchungen zur Biokompatibilität von Oxygenatoren in einem Herz-Lungen-Maschinen-Modell – Vergleich von unbeschichteten gegen heparinbeschichtete Oberflächen.

Andersson J, Ekdahl KN, Elgue G, Nilsson B, Larsson R (2003): Optimal heparin surface concentration and antithrombin binding capacity as evaluated with human non-anticoagulated blood in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 67(2): p. 458-66.

Andrade FK, Silva JP, Carvalho M, Castanheira EMS, Soares R, Gama M (2011): Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res Part A.* 98A:554–566.

Arima Y, Kawagoe M, Toda M, Iwata H (2009): Complement Activation by Polymers Carrying Hydroxyl Groups. *ACS Applied Materials & Interfaces.* *Ärzteblatt, Bypasschirurgie des Herzens,* 2010

Autio I, Malo-Ranta U, Kallioniemi OP, Nikkari T (1989): Cultured bovine aortic endothelial cells secrete factor(s) chemotactic for aortic smooth muscle cells. *Artery* 16: 72-83.

Backdahl H, Helenius G, Bodin A, et al (2006): Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials.* 27(9): 2141–2149.

Bartouilh de Taillac L, Port´e-Durrieu MC, Labrug`ere CH, et al. (2004): Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. *Compos Sci Technol.* 64: 827–837.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol.Annu.Rev.* 11:127-52

Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J (1995): Platelet actuation. *Blood Reviews.* 9(3): p. 143-156

Boon, GD (1993): An overview of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 21(2):170-9

Brumer H, Zhou Q, Baumann MJ, Carlsson K, Teeri TT (2004): Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5715–5721.

Campbell EJ, O'Byrne V, Stratford PW, Quirk I, Vick TA, Wiles MC, Yianni YP (1994): Biocompatible surfaces using methacryloylphosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer. *ASAIO J.* 40(3): p. M853-7.

Campbell GR and Campbell JH (2007): Development of tissue engineered vascular grafts. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 43-50.

Capes JS, Ando HY, Cameron RE (2005): Fabrication of polymeric scaffolds with a controlled distribution of pores. *J Mater Sci Mater Med.* 16(12):1069-75.

Casscells W (1992): Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 86: 723-729.

Chen G, Ushida T, Tateishi T (2001): Preparation of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticulates. *Biomaterials.* 22(18):2563-7.

Chen RR (1977): In situ detection of mycoplasma contamination in cell culture by fluorescent Hoechst H 33258 stain. *Molecular Pharmacology* 31: 575-578.

Cho A, Mitchell L, Koopmans D and Langille BL (1997): Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 81: 328-337.

Chouinard JA, Gagnon S, Couture MG, Levesque A, Vermette P (2009): Design and validation of a pulsatile perfusion bioreactor for 3D high cell density cultures. *Biotechnol Bioeng*

Conte MS (1998): The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? *FASEB J* 12(1):43-45.

Cybulsky MI and Gimbrone MA, Jr (1991): Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791.

Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T (1999): Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 126, 847-855.

Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr. and Davies PF (1981): The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103: 177-185.

Dunkern TR, Paulitschke M, Meyer R, Buttemeyer R, Hetzer R, Burmester G, Sittinger M (1999): A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 18: 105-110.

Ebert CD, Lee ES, Kim SW (1982): The antiplatelet activity of immobilized prostacyclin. *J Biomed Mater Res.* 16(5): p. 629-38.

Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, Sterk LM, Geelkerken RH, Vermes I, Feijen J (2006): Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials.* 27: 2390-2397.

Field C, Cassano A, Allen C, Meyer A, Pawlowski KJ, Bowlin GL, Rittgers SE, Szycher M (2002): Endothelial cell seeding of a 4-mm I.D. polyurethane vascular graft. *J. Biomater. Appl.* 17, 45.

Fillinger MF, Sampson LN, Cronenwett JL, Powell RJ, Wagner RJ (1997): Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J Surg Res.* 67:169-78.

Fink H, Lage Ahrenstedt L, Krettek AA, Risberg B (2010): Bacterial cellulose modified with xyloglucan bearing the adhesion peptide RGD promotes endothelial cell adhesion and metabolism – a promising modification for vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med.*

Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC, Gallotti BJ, et al (1990): Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*;24:253e64.

Frank RD, Weber J, Dresbach H, Thelen H, Weiss C, Floege J (2001): Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int.* 60(5): p. 1972-81

Fushimi F, Nakayama M, Nishimura K, Hiyoshi T (1998): Platelet adhesion, contact phase coagulation activation, and C5a generation of polyethylene glycol acid-grafted high flux cellulosic membrane with varieties of grafting amounts. *Artif Organs.* 22(10): p. 821-6

Garcia-Ochoa F and Gomez E (2008): Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv.*

Glacken MW, Fleischaker RJ, Sinskey AJ (1983): Large-scale production of mammalian cells and their products: engineering principles and barriers to scale-up. *Ann N Y Acad Sci.* 413: 355-372.

Glacken MW, Fleischaker RJ, Sinskey AJ (1986): Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 28: 1376-1389.

Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziari R, Noguera I, Rifkin DB (1997): TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*. 15:190–7.

Godbey WT, Hindy SB, Sherman ME, Atala A (2004): A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials*. 25(14):2799-805.

Gorbet MB and Sefton MV (2004): Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 25(26):p. 5681-5703.

Gaziano T, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V. Cardiovascular disease. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. chapter 33. Washington, DC, USA: World Bank; 2006

Greene MA, Malias MA (2001): Arm complications after radial artery procurement for coronary bypass operation. *Ann Thorac Surg* 72,126–128.
Greisler HP (1990): Interactions at the blood/material interface. *Ann Vasc Surg* 4(1):98–103.

Greisler HP, Wise D, Trantolo D, et al (1996): Regulation of vascular graft healing by induction of tissue incorporation. In: Wise, D., editor. *Human Biomaterials Applications*. Vol. 227. Humana Press; Totowa, NJ, USA.

Großgebauer K, Kegel M, Dann O (1976): Neues fluoreszenzoptisches Verfahren in der medizinisch-diagnostischen Mikrobiologie. *DMW* 101: 1098-1099.

Hanus J and Mazeau K (2006): The xyloglucan–cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers*. 82: 59–73.

He GW and Yang CQ (1997): Superiority of hyperpolarizing to depolarizing cardioplegia in protection of coronary endothelial function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 114: 643-650.

Heinle H, Sigg G, Reich A, Thiedemann KU (1984): Metabolic effects of direct current stimulation on cultured vascular smooth muscle cells. *Z Naturforsch [C]*. 39: 1141-1144.

Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B (2006): In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*. 76(2): p. 431-8

Hellstrand P, Johansson B, Norberg K (1977): Mechanical, electrical, and biochemical effects of hypoxia and substrate removal on spontaneously active vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 100: 69-83.

Herring M, Gardner A, Glover J (1978): A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*. 84(4): p. 498-504.

Heydarkhan-Hagvall S, Helenius G, Johansson BR, Li JY, Mattsson E, Risberg B (2003): Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors. *J Cell Biochem*. 89:1250–9.

Higgins SP, Solan AK, Niklason LE (2003): Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 67:295e302.

Hoenicke M, Jacobs VR, Huber G, Schmid FX, Birnbaum DE (2008): Advantages of human umbilical vein scaffolds derived from cesarean section vs. vaginal delivery for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 29(8):1075-84

Hoenicke M, Jacobs VR, Niemeyer M, Bronger H, Schneider KTM, Kiechle M, Huber G, Seelbach-Göbel B, Burkhart J, Hammer J, Liesch D, Schmid C, Birnbaum DE (2012): Neue Verwendungsmöglichkeiten von Nachgeburtsgewebe für die Regenerative Medizin. *Z.Geburtsh.Neonatol*. 216(1):27-33

Hoenicke M, Schrammel S, Bursa J, Huber G, Bronger H, Schmid C, Birnbaum DE (2013): Development of Endothelium-Denuded Human Umbilical Veins as Living Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts. *J.Tissue Eng.Regen.Med*. 7(4):324-336

Hoenicke M, Wiedemann L, Puehler T, Hirt S, Birnbaum DE, Schmid C (2010): Effects of Shear Forces and Pressure on Blood Vessel Function and Metabolism in a Perfusion Bioreactor. *Ann Biomed Eng*;12:3706–3723.

Hoenicke MR, Campbell GR, Campbell JH (2006): Vascular grafts and the endothelium. *Endothelium* 13: 385-401.

Hoffman AS, Schmer G, Harris C, Kraft WG (1972): Covalent binding of biomolecules to radiation-grafted hydrogels on inert polymer surfaces. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 18(0): p. 10-18.

Hogg N, Browning J, Howard T, Winterford C, Fitzpatrick D, Gobe G (1999): Apoptosis in vascular endothelial cells caused by serum deprivation, oxidative stress and transforming growth factor-beta. *Endothelium* 7: 35-49

Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H (2005): Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 1553.

Izzotti A, D'Agostini F, Balansky R, Degan P, Pennisi TM, Steele VE, De Flora S (2008): Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta. *Mutat Res.* 644: 38-42.

Jaffe EA (1987): Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 18(3): 234-9

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest.* 52(11): 2745-56

Jakobsen O, Muller S, Aarsaether E, Steensrud T, Sorlie DG (2007): Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution improves cardioprotection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 32: 493-500.

Jakobsen O, Stenberg TA, Losvik O, Ekse S, Sorlie DG, Ytrebo LM (2008): Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution preserves endothelium-derived hyperpolarization factor- dependent vasodilation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 33: 18-24.

Jetsy J, Nemerson Y, McGraw-Hill NY (1995): The pathways of blood coagulation. In: Beutler E, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams Hematology*, 5th ed. New York: McGraw-Hill. p.1227–1238.

Johnson WC and Lee KK (2000): A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: a prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *J Vasc Surg.* 32(2):268–277.

Kakisis JD, Liapis CD, Sumpio BE (2004): Effects of cyclic strain on vascular cells. *Endothelium.* 11: 17-28.

Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM (2005): Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74(1):570–581.

Kasten A, Naser T, Brüllhoff K, Fiedler J, Müller P, Möller M, Rychly J, Groll J, Brenner RE (2014): Guidance of mesenchymal stem cells on fibronectin structured hydrogel films. *PLoS ONE* 9(10): e109411. doi:10.1371/journal.pone.0109411

Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ (1998): Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng.* 5;57(1):46-54.

Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A (2005): Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44: 3358e93

Klinke R, Pape HC, Silbernagl S (2005): *Physiologie*. Thieme Verlag, 5. Auflage. Kapitel 9: 245-254.

Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG (2001): Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* 15:447-57.

Koster A, Fischer T, Praus M, Haberzettl H, Kuebler WM, Hetzer R, Kuppe H (2002): Hemostatic activation and inflammatory response during cardiopulmonary bypass: impact of heparin management. *Anesthesiology*, 97(4): p. 837-41.

Kottke-Marchant K, Anderson JM, Umemura Y, Marchant RE (1989): Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron arterial prostheses. *Biomaterials.* 10(3): p. 147-55

Kubota Y, Kleinman H, Martin G, Lawley T (1988): Role of laminin and basement membrane proteins in the morphological differentiation of human endothelial cells in capillary-like structures. *J Cell Biol.* 107: 1589-1598.

Kuhn PC (2005): Nachweis einer ausgeprägten proinflammatorischen Reagibilität der Koronarendothelzellen am Modell der „patienten-spezifischen“ Endothelzellkultur.

Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W (2006): Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120:134e41.

Lavender MD, Pang Z, Wallace CS, Niklason LE, Truskey GA (2005): A system for the direct co-culture of endothelium on smooth muscle cells. *Biomaterials* 26: 4642-4653.

Lee JW, Deng F, Yeomans WG, Allen AL, Gross RA, Kaplan DL (2001): Direct incorporation of glucosamine and N-acetylglucosamine into exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245: production of chitosanecellulose and chitinecellulose exopolymers. *Appl Environ Microbiol*;67:3970e5.

Levick JR (2003): *An introduction to cardiovascular physiology*. 4th Ed. London, Hodder and Stoughton.

Lim HR, Baek HS, Lee MH, Woo YI, Han DW, Han MH, Baik HK, Choi WS, Park KD, Chung KH, Park JC (2008): Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films by microwave-induced argon plasma. *Surface and Coatings Technology*. 202(22-23): p. 5768-5772.

Lindqvist A, Dreja K, Sward K, Hellstrand P (2002): Effects of oxygen tension on energetics of cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H110-H117.

Losel-Sadee H and Alefelder C (2009): Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for infragenicular bypass: five-year results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 50(3): p. 339-43.

Ma PX und Choi JW (2001): Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng*. 7(1):23-33.

Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA (1991): Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest*. 88:904-10.

Mall JW, Philipp AW, Rademacher A, Paulitschke M and Buttemeyer R (2004): Re-endothelialization of punctured ePTFE graft: an in vitro study under pulsed perfusion conditions. *Nephrol Dial Transplant* 19: 61-67.

Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P (2001): Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of Immunological Methods*, 254, 183-190.

Martínez H, Brackmann C, Enejder A, Gatenholm P (2012): Mechanical stimulation of fibroblasts in micro-channeled bacterial cellulose scaffolds enhances production of oriented collagen fibers. *J Biomed Mater Res Part A*. 100A:948-957

Massia SP und Hubbell JA (1990): Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci*. 589:261-70.

Merrill EW, Salzman EW, Wan S, Mahmud N, Kushner L, Lindon JN, Curme J (1982): Platelet-compatible hydrophilic segmented polyurethanes from polyethylene glycols and cyclohexane diisocyanate. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 28: p. 482-7.

Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R (1994): Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*. 15(1):55-8.

Mitchell SL and Niklason LE (2003): Requirements for growing tissueengineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:59–64.

Moller P, Wallin H, Holst E, Knudsen LE (2002): Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. *FASEB J.* 16: 45-53.

Morimoto Y, Kohyama S, Nakai K, Matsuo H, Karasawa F, Kikuchi M (2003): Long-term effects of UV light on contractility of rat arteries in vivo. *Photochem Photobiol.* 78: 372-376.

Nasseri BA, Pomerantseva I, Kaazempur-Mofrad MR, Sutherland FW, Perry T, Ochoa E, Thompson CA, Mayer JE, Oesterle SN, Vacanti JP (2003): Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation. *Tissue Eng.* 9, 291.

Nasseri BA, Vacanti JP (2002): Tissue engineering in the 21st century. *Surg Technol Int.*10,25–37.

Ng R, Gurm JS, and Yang ST (2010): Centrifugal Seeding of Mammalian Cells in Nonwoven Fibrous Matrices. *Biotechnol. Prog.* 26: 239–245.

Nielsen LB (1996): Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 123:1–15.

Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanaawala A, Sanzgiri S, Langer R (2001): Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J Vasc Surg* 33: 628-638.

Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL (2007): A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* 366, 197–206.

Niwa K, Kado T, Sakai J, Karino T (2004): The effects of a shear flow on the uptake of LDL and acetylated LDL by an EC monoculture and an EC–SMC coculture. *Ann Biomed Eng;*32:537–43.

Olinger GN, Boerboom LE, Bonchek LI, Hutchinson LD, Kissebah AH (1983): Hyperkalemia in cardioplegic solutions causing increased cholesterol accumulation in vein grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 85: 590-594.

Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W, Martin DP, Degenkolbe I, Wahlers T, Stock UA (2004): Tissue engineering of bovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng.* 32: 212-222.

Padera RF and Schoen FJ (2004): Cardiovascular medical devices. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. Biomaterials Science. San Diego, CA: Elsevier, Academic Press. p 470–494.

Paul RJ, Krisanda JM, Lynch RM (1984): Vascular smooth muscle energetics. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2: S320-S327.

Petersen N und Gatenholm P (2001): Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Issue 5, pp 1277-1286

Pibarot P and Dumesnil JG (2009): Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*, 119(7): p. 1034-48.

Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000): The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*,. 440(5): p. 653-666.

Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006): Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem* 54: 385

Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R, Hetzer R (2001): Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. *Int J Artif Organs*. 24: 235-242.

Ratner BD (2007): The catastrophe revisited: Blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials* 28:5144–5147.

Riesenfeld J, Olsson P, Sanchez J, Mollnes TE (1995): Surface modification with functionally active heparin. *Med Device Technol*. 6(2): p. 24-31.

Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C (2005): Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng* 33: 772-779.

Roh JD, Nelson GN, Udelsman BV, Brennan MP, Lockhart B, Fong PM, Lopez-Soler RI, Saltzman WM, Breuer CK (2007): Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds. *Tissue Eng*. 13(11):2743-9.

Sato Y and Rifkin DB (1989): Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol*. 109:309–15.

Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182: 311–322.

Schuster N and Krieglstein K (2002): Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307:1–14.

Seeger JM and Klingman N (1988): Improved in vivo endothelialization of prosthetic grafts by surface modification with fibronectin. *J Vasc Surg.* 8(4): 476-82

Sefton MV, Gemmell CH, Gorbet MB (2000): What really is blood compatibility? *J Biomater Sci Polym Ed.* 11(11): 1165-82

Sefton MV, Sawyer A, Gorbet M, Black JP, Cheng E, Gemmell C, Pottinger-Cooper E (2001): Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers? *Journal of Biomedical Materials Research.* 55(4): 447-459

Serafica G, Mormino R, Bungay H (2002): Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58(6):756-60

Shimizu RT, Blank RS, Jervis R, Lawrenz-Smith SC, Owens GK (1995): The Smooth Muscle α -Actin Gene Promoter Is Differentially Regulated in Smooth Muscle versus Non-smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry,* 270, 7631-7643.

Solchaga LA, Tognana E, Penick K, Baskaran H, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2006): A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs. *Tissue Eng.* 12, 1851.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B (1987): Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 105:1039–45.

Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, Losordo DW (1997): Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J Mol.Cell Cardiol.,* 29:1321-1330.

Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, et al (2005): Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials;*26:419e31.

Tamilarasan KP, Kolluru GK, Rajaram M, Indhumathy M, Saranya R, Chatterjee S (2006): Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 7:17.

Technau-Ihling K, Ihling C, Kromeier J, Brandner G. (2001): Influenza A virus infection of mice induces nuclear accumulation of the tumorsuppressor protein p53 in the lung. *Archives of Virology* 146: 1-12.

Toda M, Kitazawa T, Hirata I, Hirano Y, Iwata H (2008): Complement activation on surfaces carrying amino groups. *Biomaterials*. 29(4): 407-417.

Vacanti JP, Langer R (1999): Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 354(Suppl 1),SI32–SI34.

van Buul-Wortelboer MF, Brinkman HJ, Dingemans KP, de Groot PG, van Aken WG, van Mourik JA (1986): Reconstitution of the vascular wall in vitro. A novel model to study interactions between endothelial and smooth muscle cells. *Exp Cell Res*;162:151–8.

van Kempen MJ and Jongsma HJ (1999): Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol*.112:479–86.

Verma S, Szmitko PE, Weisel RD, Bonneau D, Latter D, Errett L, LeClerc Y, Fremes SE (2004): Should radial arteries be used routinely for coronary artery bypass grafting? *Circulation* 110(5):e40–e46.

Vyalov S, Langille BL and Gotlieb AI (1996): Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *Am J Pathol* 149: 2107-2118.

Wachtler F (2005): *Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Herausgegeben von Franz Wachtler, facultas-Verlag, 7.Auflage, Seite 30.

Weinberg CB und Bell E (1986): A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231(4736):397–400.

Wiedemann L (2010): Etablierung einer Methodik zur Konditionierung von Blutgefäßen im Durchflussmodell.

Williams, DF (1999): *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool Univ. Press

Wippermann J, Schumann D, Klemm D, Kosmehl H, Salehi-Gelani S, Wahlers T (2009): Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 37, 592e596.

Wittemore AD, Kent KC, Donaldson MC, Couch NP, Mannick JA (1989): What is the proper role of polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal reconstruction? *J Vasc Surg* 10:299–305.

Xue L and Greisler HP (2003): Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg*. 37(2):472–480.

Zahedmanesh H, Mackle JN, Sellborn A, Drotz K, Bodin A, Gatenholm P, Lally C (2011): Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. Published online 2 February 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.31791.

Zhao F and Ma T (2005): Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng.* 91: 482-493.

Zhou XB, Xing RY, Lv X (2005): Characterization of the changes in protease of *Deinococcus radiodurans* following irradiation. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 45(2):264-9.

Zhou Q, Baumann MJ, Brumer H, Teeri TT (2006): The influence of surface chemical composition on the adsorption of xyloglucan to chemical and mechanical pulps. *Carbohydr. Polym.* 63, 449-458.

Zhou W, Ibe BO, Raj JU (2007): Platelet-activating factor induces ovine fetal pulmonary venous smooth muscle cell proliferation: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2773-H2781

Ziegler T, Alexander RW, Nerem RM (1995): An endothelial cell-smooth muscle cell co-culture model for use in the investigation of flow effects on vascular biology. *Ann Biomed Eng*;23:216-25.

Zilla P, Bezuidenhout D, Human P (2007): Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 28: 5009-5027

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Mai 2015

Franz Hilber

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer **PD Dr. rer. nat. Markus Hönicka**, der nach der Zeit in Regensburg nun Leiter des Forschungslabors der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie in Ulm ist.

Die einzigartige Betreuung und immerwährende Motivation während der experimentellen Arbeit, auch in den Stunden des Misserfolges, haben mir eine lehrreiche und horizontenerweiternde Zeit im Labor beschert, die ich unter keinen Umständen missen möchte.

Die überragende Unterstützung und den Grundstein der Versuche lieferte auch das gesamte Team im Labor, besonderer Dank gilt hierbei **Katrin Bielenberg**, die mich von der ersten Stunde an der Pipette bis zum Abschluss der Arbeit begleitete.

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Christof Schmid** danke ich herzlich für die Möglichkeit, in einem professionell geführten Forschungslabor erste eigene Schritte entwickelt zu haben.