Etablierung einer neuen Methode zur bioreaktorgestützten Entwicklung von „Tissue Engineered Vascular Grafts“

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.)
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Schulte
aus

Paderborn

Jahr

2017
Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Überfuhr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker
Prof. Dr. Andreas Dendorfer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.-Ing. Bassil Akra

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2017
# Inhaltsverzeichnis

1 **Zusammenfassung** ........................................................................................................... 6

2 **Einleitung** ....................................................................................................................... 8

2.1 Das menschliche Gefäßsystem ......................................................................................... 8

   2.1.1 Physiologischer Aufbau des menschlichen Gefäßsystems ......................................... 8

   2.1.2 Pathologie von Gefäßen und die Behandlung von Gefäßkrankheiten ......................... 9

   2.1.3 Anforderungen an einen optimalen Gefäßersatz ....................................................... 11

2.2 Tissue Engineering von Gefäßersatz ............................................................................... 12

   2.2.1 Scaffoldmaterialien, Zellen und Bioreaktoren ......................................................... 13

2.3 Zielvorstellung .................................................................................................................. 16

3 **Material und Methoden** .................................................................................................. 18

3.1 Gefäßscaffolds .................................................................................................................. 18

   3.1.1 Polyurethan ................................................................................................................. 18

   3.1.2 Collagen ....................................................................................................................... 19

   3.1.3 Humane dezellularisierte Venen ............................................................................... 19

   3.1.4 Bakterielle Cellulose ................................................................................................. 20

3.2 Zellen .................................................................................................................................. 20

   3.2.1 Zellisolation ................................................................................................................ 20

   3.2.2 Zellkultivierung ......................................................................................................... 22

   3.2.3 Zellzählung ................................................................................................................. 23

3.3 Bioreaktor .......................................................................................................................... 24

   3.3.1 Aufbau des Bioreaktors ............................................................................................. 24

   3.3.2 Umbau zur Optimierung des Bioreaktors ................................................................. 25

   3.3.3 Sterilisation des Bioreaktors ...................................................................................... 25

   3.3.4 Druckmessung im Bioreaktor .................................................................................... 26

   3.3.5 Besiedlung verschiedener Scaffoldmaterialien ......................................................... 26

   3.3.6 Besiedlung im Bioreaktor ......................................................................................... 27

   3.3.7 Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor ....................................................... 28

3.4 Auswertungsmethoden .................................................................................................... 30
### Inhaltsverzeichnis

| 3.4.1 | Immunfärbung | 30 |
| 3.4.2 | Rasterelektronenmikroskopie | 37 |
| 3.4.3 | RNA-Expressionsuntersuchung | 38 |

#### 4 Ergebnisse

| 4.1 | Untersuchung der Scaffoldmaterialien | 40 |
| 4.1.1 | Rasterelektronenmikroskopie | 40 |
| 4.1.2 | Immunhistochemie | 42 |
| 4.2 | Qualifizierung der Zellen | 42 |
| 4.3 | Umbaumaßnahmen am Bioreaktor | 43 |
| 4.3.1 | Sterilität | 44 |
| 4.3.2 | Parallele Besiedlung von zwei TEVGs | 45 |
| 4.3.3 | Dynamische Besiedlungsbedingungen | 46 |
| 4.3.4 | Konditionierung der TEVGs und Austausch der Pumpe | 47 |
| 4.3.5 | Vereinfachtes Handling | 49 |
| 4.4 | Besiedlungsversuche ohne Fluss | 50 |
| 4.4.1 | Polyurethan | 50 |
| 4.4.2 | Collagen | 52 |
| 4.4.3 | Humane dezellularisierte Venen | 53 |
| 4.4.4 | Bakterielle Cellulose | 54 |
| 4.5 | Etablierung des Perfusionsprotokolls | 55 |
| 4.6 | Flussversuche mit dem Bioreaktor | 58 |
| 4.6.1 | Rasterelektronenmikroskopie | 58 |
| 4.6.2 | Immunhistochemie | 60 |
| 4.6.3 | RNA-Expressionsuntersuchung | 67 |
| 4.7 | Zusammenfassung | 68 |

#### 5 Diskussion

| 5.1 | Prozessentwicklung zur Verwendung des Bioreaktors | 69 |
| 5.2 | Potential des „all-in-one“-BR für die kommerzielle Herstellung von TEVG | 71 |
| 5.3 | Besiedlungserfolg und Eigenschaften der einzelnen Scaffoldmaterialien | 72 |

#### 6 Ausblick

| 6.1 | | 76 |
Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis ...................................................................................................................77
II. Abbildungsverzeichnis ..................................................................................................................79
III. Tabellenverzeichnis ....................................................................................................................84
IV. Literaturverzeichnis ...................................................................................................................85
7 Eidesstattliche Versicherung .........................................................................................................92
8 Lebenslauf ....................................................................................................................................93
9 Danksagung ...................................................................................................................................94
10 Vorveröffentlichung: ...................................................................................................................96
1 Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziel der Arbeit:** Der Bedarf an Prothesen zur Verwendung als Bypassmaterial steigt mit zunehmender Alterung unserer Gesellschaft. Die gängigen Bypassprothesen zur Revaskularisierung nach Herzinfarkt sind innere Brustarterien oder Venen des Patienten. Diese haben jedoch verschiedene Limitationen. Die Gefäße können mit der Zeit degenerieren und es können sich beispielsweise Aneuryisma oder erneute Verschlüsse bilden, so dass die Suche nach idealen Gefäßprothesen weiterhin relevant ist.


**Material und Methoden:** Im Rahmen der Bioreaktor-Validierung wurden das Handling und die Dichtigkeit des Reaktors verbessert und die Sterilität durch Sichtkontrolle und mikrobiologische Untersuchungen des Kulturmmediums überprüft. Die suffiziente Zahl von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ cm$^2$ (Fibroblasten und Endothelzellen aus der *vena saphena magna*) zur Besiedlung der Gerüstmaterialien wurde auf Basis eigener empirischer Forschung sowie auf Grundlage von Literaturrecherche ermittelt. Ebenso wurden die Zellen mit sukzessiv steigenden Scherkräften von 10 bis 40 dyn/cm$^2$ konditioniert und eine vollständige Besiedlung der der Scaffoldmaterialien innerhalb von lediglich 6 Tagen ermöglicht. Verschiedene Trägermaterialien (Polyurethan, Collagen, dezellularisierte Venen und bakterielle Cellulose) wurden schließlich mit dem etablierten Protokoll besiedelt und, abgesehen von dezellularisierten Venen, mit denen die Besiedlung nicht möglich war, konditioniert. Anschließend erfolgte die vergleichende Auswertung der besiedelten Scaffolds mittels Rasterelektronenmikroskopie, Immunhistochemie und rt-PCR.

**Ergebnisse:** Die Etablierung eines einfachen Protokolls, das die Herstellung einer Gefäßprothese innerhalb von 3 Wochen nach Entnahme der Spenderzellen ermöglicht, wurde nach Anpassungen am Bioreaktor erfolgreich umgesetzt. Die Verbesserungen umfassten das Hinzufügen zahlreicher Adapter und neuer Schläuche, um die Dichtigkeit des Bioreaktors zu gewährleisten und das Füllen zu vereinfachen. Außerdem wurde die Rotation des Besiedlungszylinders durch einen zusätzlichen Keilriemen zum Antrieb der hinteren Walze des Mixers gesichert. Die ursprünglich verwendete Pumpe wurde gegen ein Modell ausgetauscht,


Schließlich sind insbesondere die bakterielle Cellulose und Polyurethan in der chirurgischen Handhabbarkeit gut geeignet was für den Einsatz beim Patienten essentiell ist.

**Ausblick:** Für eine routinemäßige Verwendung des Bioreaktors zur Generierung von Gefäßprothesen „at the bedside“ für die klinische Anwendung sollte im Folgenden die Besiedlungseinheit des Bioreaktors als Einwegmaterial entwickelt werden. Darüber hinaus sollte die Erforschung der bakteriellen Cellulose weiter vorangetrieben werden, da diese sich als äußerst interessantes nicht degradables Material erwiesen hat.
2 Einleitung

Im Jahr 2012 belegten ischämische Herzkrankheiten und Schlaganfälle die ersten beiden Plätze der 10 häufigsten Todesursachen weltweit mit insgesamt 24,1 % [1]. Arteriosklerose und ein daraus resultierender Gefäßverschluss wird als maßgebliche Ursache für die Krankheiten genannt.


2.1 Das menschliche Gefäßsystem

2.1.1 Physiologischer Aufbau des menschlichen Gefäßsystems

Gefäße bestehen aus 3 verschiedenen Schichten, denen unterschiedliche Aufgaben zukommen.

Abbildung 2-1: Darstellung des Aufbaus von Gefäßen (modifiziert nach [4])


Venen weisen im Gegensatz zu Arterien Venenklappen auf, die einen Rückstrom des Blutes verhindern und besitzen dünnere Gefäßwände durch eine weniger stark ausgeprägte Muskelzellschicht.

Gefäße können während der Embryonalentwicklung durch Vaskulogenese entstehen, sowie auch im adulten Organismus, durch Angiogenese. Die Angiogenese geht zum Teil mit pathologischen Vorgängen, beispielsweise beim Krebswachstum, einher [6].

2.1.2 Pathologie von Gefäßen und die Behandlung von Gefäßkrankheiten

Die häufigste Ursache für Gefäßleiden ist die Arteriosklerose, die meist jahrelang symptomfrei bleibt und sich erst im Endstadium bemerkbar macht.

Zur Entstehung der Arteriosklerose gibt es verschiedene Erklärungsansätze.


Bei der „Lipidhypothese“ (vgl. Abbildung 2-2) wird postuliert, dass die Einwanderung von Monozyten durch Chemotaxis ausgelöst wird (Abbildung 2-2, Abschnitt 1), wobei insbesondere MCP-1 (engl.: Monocyte Chemoattractant Protein-1) sowie LDL (engl.: Low-Density-Lipoprotein) als Attraktants genannt werden. Die eingewanderten Monozyten differenzieren dann im Subendothelialraum zu Makrophagen und werden durch ungehemmte Aufnahme von LDL zu sogenannten Schaumzellen. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion angestoßen, welche die Bildung weiterer Adhäsionsmoleküle und die fortlaufende Aufnahme
von Immunzellen induziert. Proliferierende glatte Muskelzellen der Media verdicken die Gefäßwand zusätzlich.


Innerhalb von Minuten wird das Hämostasesystem an der Einrissstelle aktiviert (Abbildung 2-2, Abschnitt 4) und ein intravaskulärer Thrombus kann zum vollständigen Verschluss des Gefäßes und somit zum Beispiel zum Infarkt führen.


Knapp zusammengefasst ist das Herz Opfer seines hohen Stoffwechsels, da es seinen Energiebedarf zu etwa 70 % durch Fettsäuren deckt. Diese Fettsäuren können eine
endotheliale Apoptose triggern, was einer Verletzung des Endothels entspricht und so die Kaskade bis zum (Myokard-)Infarkt einleitet. Die Gefahr der Plaqueruptur wird durch die apoptotische Wirkung der Fettsäuren auf die Endothelzellen verstärkt.

Die Strategie bei der Behandlung sieht zunächst vor die Risikofaktoren der Patienten, unter anderem mit Medikamenten, zu senken. Sollten die Medikamente nicht mehr ausreichend helfen, wird ein interventioneller Eingriff notwendig, bei dem entweder eine kathetergestützte Aufweitung des Gefäßes mit möglicher Stentimplantation erfolgt oder die stenosierten Gefäße mit Prothesen überbrückt werden [9].


### 2.1.3 Anforderungen an einen optimalen Gefäßersatz

Beim Gefäßersatz in Folge von Arteriosklerose, Gefäßverschluss oder Verschleiß durch regelmäßige Punktion (bei Dialysepatienten) weisen die derzeit verfügbaren Prothesen verschiedene Nachteile und Limitationen auf.

Tabelle 2-1: Ansprüche an optimale Gefäßprothesen sowie Vor- und Nachteile von Homografts und ePTFE-Prothesen [12]–[16]. Die Bedingungen sind zum Teil nicht erfüllt (−), bedingt erfüllt (+) oder vollständig erfüllt (++).

<table>
<thead>
<tr>
<th>Ansprüche an optimale Gefäßprothesen</th>
<th>Homografts</th>
<th>ePTFE-Prothesen</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Druckresistenz</td>
<td>± je nach verfügbarem Gefäß</td>
<td>++</td>
</tr>
<tr>
<td>Keine Bildung von Aneurysmen</td>
<td>± je nach verfügbarem Gefäß</td>
<td>++</td>
</tr>
<tr>
<td>Keine Toxizität</td>
<td>++</td>
<td>± Fremdmaterial</td>
</tr>
<tr>
<td>Resistenz gegen Thrombosen und Infektionen</td>
<td>± bei Entnahme ohne Verletzung des Gefäßes</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Resistenz gegen intimale Hyperplasie</td>
<td>± bei Entnahme ohne Verletzung des Gefäßes</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Chirurgische Handhabbarkeit</td>
<td>++</td>
<td>++</td>
</tr>
<tr>
<td>Hohe Lebensdauer</td>
<td>± je nach verfügbarem Gefäß</td>
<td>± sofern keine vorzeitige Re-Stenose auftritt</td>
</tr>
<tr>
<td>Elastizität</td>
<td>±</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Compliance</td>
<td>± je nach verfügbarem Gefäß</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Geringe Herstellungskosten</td>
<td>++</td>
<td>++</td>
</tr>
<tr>
<td>Limitationen</td>
<td>Erfolg abhängig von:</td>
<td>Material ungeeignet bei Gefäßdurchmesser &lt; 6 mm</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>- Erfahrung des Arztes</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>- Qualität des verfügbaren Gefäßes</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Noch schwieriger sind die Ansprüche an Prothesen für den Einsatz bei Kindern zu erfüllen, da hier zusätzlich ein Mitwachsen der Prothese erwünscht ist um spätere Re-Operationen zu vermeiden. Wünschenswert wäre, dass das ursprünglich verwendete Prothesenmaterial mit der Zeit vollständig durch die körpereigenen Zellen des jungen Patienten ersetzt werden, weshalb hier vermehrt abbaubare Materialien im Fokus stehen (vgl. 2.2.1).

### 2.2 Tissue Engineering von Gefäßersatz

Seit der Entwicklung einer Gefäßprothese auf Basis von Collagen von Weinberg und Bell, welche allerdings ohne zusätzliche Verstärkung durch Dracon-Netze keinen starken Druckbelastungen standgehalten hat [17], wurden in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen Anstrengungen unternommen, nach den Grundsätzen des Tissue Engineering (TE) die Probleme der aktuellen Prothesen zu beheben. Bei der Entwicklung von Gefäßprothesen, die mittels TE produziert werden (TEVG, engl.: tissue engineered vascular graft) und die genannten Einschränkungen überwinden, wird insbesondere darauf...
hingearbeitet, dass funktionale Gefäßprothesen mit einem Innendurchmesser kleiner als 6 mm etabliert werden [18]–[21].

Eine eher kleine Anzahl von Studien arbeitet ohne Hilfsstrukturen aus verschiedenen Scaffoldmaterialien. Dieses Vorgehen sorgt für eine äußerst aufwändige Herstellung, die viel Know-How benötigt und entsprechend hohe Kosten verursacht. So kultivierte L'Heureux Hautfibroblasten in Form eines flächigen Zellverbandes. Dieser wurde auf einem Stab aufgebracht, welcher nach der Fusion der Fibroblasten zur Röhre wieder entfernt wurde. Weitere Prozessierung ermöglichte eine Druckresistenz bis zu 2000 mmHg und einen erfolgreichen Einsatz im Hundemodell [14], [22].

2.2.1 Scaffoldmaterialien, Zellen und Bioreaktoren

Neben den gerüstfreien Ansätzen zur Entwicklung des optimalen Gefäßersatzes sind verschiedenste organische und synthetische, resorbierbare und nicht resorbierbare Werkstoffe in der Verwendung [18].

Bei organischen Allo- und Xenografts besteht neben ethischen Bedenken auch die Gefahr unerwünschter Infektionen oder Abstoßungsreaktionen. Das Immunsystem des Patienten kann aber auch bei synthetischen Materialien ansprechen und darüber hinaus auch das Gerinnungssystem. Eine vorherige Beschichtung beispielsweise mit Heparin kann helfen Verschlüsse durch Gerinnungsprozesse zu verhindern [23], eine Beschichtung mit Paclitaxel kann eine Hyperplasie unterdrücken [24]. Die unterschiedlichen Beschichtungen zeigen einen positiven Effekt auf die Einsatzfähigkeit der Scaffoldmaterialien, doch meist wird die Beschichtung durch Scherstress im Blutkreislauf geschädigt [25].

2.2.1.1 Zellen zum Einsatz im Tissue Engineering


Stammzellen wird in verschiedenen Studien, abhängig von Ihrem Ursprung, hohes Proliferations- und Heilungspotential bescheinigt [29]–[31]. Allerdings bestehen bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen ethische und rechtliche Bedenken, so dass ihr Einsatz im TE derzeit in Deutschland keine nennenswerte Anwendung findet. Darüber hinaus kann es zu unerwünschten Reaktionen kommen, da die Zellen Entartungspotential aufweisen, die Mechanismen zur zielgerichteten Differenzierung der Zellen noch nicht völlig verstanden sind und eine immunologische Abstoßung durch den allogenen Ursprung des Materials auftreten kann [32], [33].

Adulte Stammzellen, gewonnen beispielsweise aus dem Knochenmark oder dem Blut des Patienten, können ohne ethische Bedenken verwendet werden und sind autologen Ursprungs. Dennoch ist hier die Transdifferenzierung der Zellen nicht mit der benötigten Sicherheit und
Effizienz möglich, so dass Stammzellen bislang keine Standardoption für das TE darstellen [34].

Autologe Endothelzellen (EC, engl.: endothelial cells) aus einer Beinvene, zumeist der Vena saphena magna (VSM), sprechen weder das Immunsystem an, noch haben sie Entartungspotential. Um die Zellen zu gewinnen ist aber ein invasiver chirurgischer Eingriff notwendig, bei welchem dem Patienten gesundes vaskuläres Gewebe entnommen wird [35].


Es ist bekannt, dass EC durch mechanische Kräfte, wie hydrostatischen Druck oder Scherstress, in ihrem Phänotyp beeinflusst werden [37], [38]. Yazdani et al. konnten zeigen, dass die Konditionierung von auf dezellularisierten Venen aufgebrachten EC mittels pulsatilem Scherstress im Vergleich zu statischer Besiedlung zu einer deutlich erhöhten Resistenz des Zellmonolayers gegenüber Blutbestandteilen führte [39].

Wenn die Stimulation der Zellen zu gering ausfällt oder vollständig fehlt, führt dies zu unzureichenden Zell-Zell-Kontakten und einer eingeschränkten Fähigkeit, eine gewebeähnliche Struktur auszubilden [40], [41]. Die Zellen dedifferenzieren und es wird keine ausreichend starke extrazelluläre Matrix (ECM, engl.: extracellular matrix) gebildet [42]. Um die gleichen Funktionen wie natürliche Gefäße zu haben, sollte die ECM des TEVG der ECM natürlicher Gefäße möglichst ähneln [43].

Für eine weitere Stärkung der ECM und damit eine höhere Stabilität der Zell-Matrix-Interaktion, kann das Scaffold vorab mit Fibroblasten (FB) besiedelt werden. FB sind Teil von gesunden,
nativen Gefäßen und bilden darüber hinaus eine ECM, die die Verankerung der Zellen am Scaffold begünstigt [44], [45]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden EC in Kombination mit FB für die Besiedlung der Scaffolds verwendet.

2.2.1.2 Eine Auswahl von Materialien für Tissue Engineering


Collagen ist ein biologisches Scaffoldmaterial, welches mit der Zeit degradiert und vollständig abgebaut werden kann. Es wurde bereits vielfach für 3D-Kulturen und TE verwendet [33], [51], [52]. Collagen I ist eines der am stärksten konservierten Proteine in Vertebraten [53], so dass auch Collagen bovinen Ursprungs in hohem Maße für den Menschen biokompatibel ist. Die dezellularisierte humane Vene ist ein allogenesisches Material. Im Gegensatz zu autologen Venen muss hier eine Dezellularisierung vorgenommen werden um mögliche Immunantworten auszuschalten. Dennoch kommt es innerhalb der ersten 3 Jahre nach Implantation häufig zu erneuten Problemen mit den Allografts, kurz CAV (engl.: Cardiac Allograft Vasculopathy) [54], [55]. Olender et al. zeigten auf, dass die Revitalisierung, sprich die Besiedlung mit zumeist patienteneigenen Zellen, von dezellularisierten Allografts in vielen Geweben und insbesondere auch bei Blutgefäßen bezüglich Haltbarkeit und Akzeptanz den unbesiedelten Allografts überlegen war [56].


2.2.1.3 Bioreaktoren für das Tissue Engineering

Die Nutzung des eigenen Körpers als Bioreaktor (BR) zur Besiedlung einer Gefäßstruktur ist ein experimentell Ansatz welcher von Campell et al. verfolgt wurde. Eine in die Peritonealhöhle eingesetzte Polymerröhre wurde innerhalb von 3 Wochen mit
Einleitung

hämatopoetischen Zellen der Peritonealflüssigkeit besiedelt. Nach der Entfernung aus der Bauchhöhle war das resultierende Gefäß bis 2500 mmHg druckstabil und zeigte im Hundemodell bei autologer Implantation in die Femoralarterie gute Offenheitsraten [61]. Ein weitaus größerer Anteil der Forschergruppen bedient sich allerdings eines BR zur in vitro-Herstellung von TEVG [10], [61]–[65].

Hierbei fordern Martin et al. für eine realistische Anwendung von BR im custom-made Tissue Engineering einen in hohem Maße „selbstständigen“ BR. Prothesen sollen in einem geschlossenen System unter Beobachtung verschiedener Parameter wie CO₂, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, unter einheitlichen Bedingungen und den Richtlinien der guten Herstellungspraxis (GMP, engl.: Good Manufacturing Practice) produziert werden [66]. So können sowohl Ergebnisse leicht reproduziert als auch die Kosten für eine routinemäßige Produktion von (Gefäß-)Prothesen gering gehalten werden.


2.3 Zielvorstellung


1. Röhrren aus Polyurethan, Collagen und bakterieller Cellulose sowie dezellularisierte humane Venen werden im BR ohne Perfusion mit primären humanen FB und EC aus
der Vena saphena magna besiedelt und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

2. Anhand des am zuverlässigsten besiedelten Materials werden die Einstellungsparameter des BR, Besiedlungszeiten und erforderliche Zellzahlen für die Besiedlung bestimmt. Auch hier erfolgt die Auswertung mit Hilfe der REM.

   a. Die REM dient der Untersuchung des Besiedlungserfolges und der Morphologie der resultierenden Zellschicht.
   c. Mit der rt-PCR soll darüber hinaus eine weitere Methode verwendet und Ergebnisse aus der IHC im biologischen Zusammenhang überprüft werden. Die Marker IL-1α, IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM werden herangezogen um die Zellantwort auf die Trägermaterialien und die Konditionierung zu untersuchen.
3 Material und Methoden

3.1 Gefäßscaffolds

3.1.1 Polyurethan

PU ist ein Kunststoffpolymer das von der ITV-Denkendorf nach einem patentierten Verfahren (Patentnummer US 4474630A: [78]; auch DE 2806030C2) als elastische Röhre (Abbildung 3-1) produziert werden kann.

![Polyurethan-Röhre mit 25 Schichten PU](image1)

Das PU mit der Handelsbezeichnung Vasomer® wurde in Chloroform gelöst und als Polymerlösung unter Druckluft mit einer Sprühvorrichtung auf einen rotierenden und schwenkbaren Stab aufgebracht, wobei die Fasern miteinander verkleben (Abbildung 3-2). Die Eigenschaften der produzierten Röhre hingen von der Zusammensetzung der Polymerlösung, dem verwendeten Druck, der Ausrichtung und der Rotationsgeschwindigkeit des Stabes sowie der Menge an verwendetem Polymer ab. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft war, konnte die Prothese vom Stab entfernt werden.

![Schematische Darstellung der Sprühvorrichtung](image2)

*Abbildung 3-1*: Polyurethan-Röhre mit 25 Schichten PU

Material und Methoden

Die Fasern der hier verwendeten Prothesen hatten einen Durchmesser von durchschnittlich 1,55 µm. Im Verlauf der Versuche wurde die Anzahl der PU-Schichten von 80 auf 25 Schichten angepasst. Die Röhren hatten eine Länge von 8 cm und einen Durchmesser von 6 mm. Für den Einsatz zur Besiedlung mit Zellen wurde das PU mit 10 kGy gamma-sterilisiert.

3.1.2 Collagen

Die Firma Viscofan Bioengineering (Weinheim, Deutschland) stellt sowohl „Collagen Cell Carrier“ (CCC) aus unvernetztem Collagen Typ 1 bovines Ursprungs her [79] als auch Röhren auf Basis von Collagen Typ 1 (Abbildung 3-3). Die Röhren haben einen Innendurchmesser von 3,5 mm und eine Länge von 80 mm.

Abbildung 3-3: Collagen-Röhre mit 3,5 mm ø, auf die verwendete Länge von 6 cm zugeschnitten

Vor der Besiedlung musste das Collagen rehydriert werden. Hierfür wurde es für 24 bis 48 h im später verwendeten Zellkulturmedium (vgl. 3.2.2) inkubiert. Im Verlauf der Rehydrierung wurde das Material schwach durchsichtig und flexibel.

Die CCC zur Verwendung in Multiwellplatten wurden zunächst in eine 24-Well-Platte überführt und mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: Phosphat buffered saline) rehydriert. In einem weiteren Schritt wurde das PBS wieder entfernt und die CCC über Nacht getrocknet, um sie zuverlässig auf dem Plattenboden zu fixieren. Anschließend konnten die CCC mit Zellkulturmedium erneut rehydriert und mit Zellen besiedelt werden.

3.1.3 Humane dezellularisierte Venen

Die humanen dezellularisierten Venen wurden von PD Dr. med Gerd Juchem von der Herzchirurgischen Klinik zur Verfügung gestellt. Ebenso wie die Venen, die zur Zellisolation (s. Kapitel 3.2.1) verwendet wurden, handelt es sich bei den dezellularisierten Venen um Reststücke der Vena saphena magna nach Bypassoperation. Die Dezellularisierung erfolgte nach einem streng vertraulichen Verfahren, welches laut Aussage von Dr. Juchem ohne zellschädigende Substanzen durchgeführt wurde und eine Lagerung der Venen bei 4 °C über einen längeren Zeitraum erlaubte. Der Innendurchmesser der Venen war variabel aber stets geringer als 6 mm und die Länge betrug mindestens 60 mm. Seitenäste an den Gefäßen wurden mit Klammern verschlossen.
3.1.4 Bakterielle Cellulose

Die vom Bakterium *Glucanacetobacter xylinus* produzierte BC wurde von der Firma Xellutec GmbH (ehem. Bioregeneration GmbH) unter dem Namen Xellulin® in Form von Patches für 24-Well-Zellkulturplatten, sowie als Röhren mit einer Länge von bis zu 6 cm und einem Durchmesser von 3,5 mm (Abbildung 3-4) zur Verfügung gestellt [80], [81]. Das Material ermöglicht es laut Herstellerangaben, im Gegensatz zur Kultivierung auf Kunststoff, Zellen über einen längeren Zeitraum auch nach Erreichen der Konfluenz vital zu erhalten und Splitten der Zellen überflüssig zu machen.

Abbildung 3-4: Röhre aus BC

Vor der Verwendung wurde das Material für mindestens 24 h im später verwendeten Zellkulturmedium vorinkubiert und das Medium unmittelbar vor dem Einsatz des Scaffolds nochmals erneuert.

3.2 Zellen

3.2.1 Zellisolation

Zur Isolation humaner FB und EC wurden Überreste der Beinvene *Vena saphena magna* (Abbildung 3-5) von Bypass-Patienten der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München verwendet.

Ein positives Votum der Ethikkommission für die Verwendung der Venen in anonymisierter Form nach entsprechender Aufklärung und unterschriebener Einverständniserklärung der Patienten lag vor. Im Jahr 2013 wurden in der Klinik 733 Eingriffe an den Koronargefäßen vorgenommen, wobei 80 % der Patienten männlich waren und das durchschnittliche Alter 71 Jahre betrug.

Abbildung 3-5: Ein Stück Beinvene zur Gewinnung von primären Endothelzellen und Fibroblasten
Die Venenstücke mit einer Länge von 5 bis 12 cm Länge wurden bei 4 °C in M199-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 0,2 % Penicillin-Streptomycin (5000 U und 5 mg/ ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelagert. Die Aufarbeitung unter sterilen Bedingungen (Laminar Airflow „Hera Safe“, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) erfolgte innerhalb von maximal 5 Tagen.

Hierzu wurden die Venen kanüliert und mit 30 ml Spülmedium (M199 mit 300 IE Heparin B. von Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland und 3 mg Gentamycin von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland; mit 1 % HSA von ZLB Behring, Bern, Schweiz) durchspült, um Blutreste zu entfernen. Ein 0,5 cm langes Stück der Vene wurde abgeschnitten und zur späteren Isolation der FB wieder in das Medium (M199 mit 0,2 % Penicillin-Streptomycin zurückgegeben). Anschließend wurde die Vene zur Isolierung der EC mit einer steril filtrierten Collagenase-Lösung (14 mg Collagenase II, 280 U von Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA in 10 ml PBS von Biochrom AG, Berlin, Deutschland; mit 1 % HSA von ZLB Behring, Bern, Schweiz) durchspült, die andere Seite mit einer Klemme verschlossen und die Vene mit leichtem Druck befüllt. Die Vene wurde in einem verschlossenen, mit warmen PBS befülltem Gefäß für 15 min im Brutshrank inkubiert.

Anschließend wurde die Collagenase-Lösung durch Zugabe von 30 ml Stopplösung (M199 mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS, engl.: fetal calf serum), Lonza GmbH, Köln, Deutschland) inaktiviert und die angedauten EC aus der Vene in ein Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gespült. Die Zellsuspension wurde bei 500 U/min (Zentrifuge „Rotina 46 R“ Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 7 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die gewonnenen Zellen wurden in 4,5 ml Endothelzellmedium (ECGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 6 % FCS und 0,2 % Penicillin-Streptomycin resuspendiert und in einer Zellkulturschale (T12, 5 cm², Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C / 5 % CO₂ kultiviert.

Um die Zellausbeute zu erhöhen wurde der Vorgang ein zweites Mal wiederholt und eine weitere Zellkulturschale angelegt.

ca. 2 Wochen wurden das Deckglas und die Gewebstücke entfernt und die Zellen gemäß Kapitel 3.2.2 in eine T175 Zellkulturflasche passagiert.
Sowohl EC als auch FB wurden nach dem Protokoll unter Kapitel 3.4.1.1 auf einem Zellkulturobjektträger (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgesät, bei Konfluenz fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Hierdurch wurde Reinheit und Qualität der Zellen bestimmt.
Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte bei FB und EC alle 2 bis 3 Tage mit entsprechendem zellspezifischem Medium.


3.2.2 Zellkultivierung
Nach erneutem Erreichen von 90 % Zelldichte wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet und je 9 vials bei Passage 3 kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml eiskaltem Einfriermedium, bestehend aus 70 % zellspezifischem Medium, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden zügig auf vorbeschriftete Kryoröhrchen (Cryo Tubes, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) verteilt, die Röhrchen verschlossen und umgehend für mindestens einen Tag bei -80°C im Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) langsam abgekühlt und anschließend in den Stickstofftank überführt.


Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig mit 37 °C warmen Zellkulturmedium versetzt. Mit einer 1000 µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde das Medium so oft auf und ab pipettiert, bis die Zellsuspension komplett aufgetaut war. Die Suspension wurde wie gewohnt zentrifugiert und die Zellen wiederum in T175 Zellkulturflaschen ausgesät.

FB erreichten in der Regel innerhalb von 5 bis 7 Tagen 90 % Zelldichte während EC bereits nach 2 bis 3 Tagen erneut gesplittet werden mussten.

### 3.2.3 Zellzählung

Zur Besiedlung der Scaffolds wurde stets eine definierte Zellzahl eingesetzt (s. Kapitel 3.3.5). Um diese zu bestimmen, wurde sich der Zählkammer Neubauer improved C-Chip (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) bedient. 10 µl gut gemischter Zellsuspension wurden mit 20 µl Tryphanblau (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Tryphanblau dringt in tote Zellen ein, nicht jedoch in lebende und ermöglicht so eine Unterscheidung. 10 µl der Suspension wurden in die Zählkammer überführt und in vier Großquadrate (s. Abbildung 3-7) die ungefärbten, lebenden Zellen ausgezählt.
Material und Methoden

Abbildung 3-7: Zähllkarten der Neubauer-Kammer; ein auszählendes Großquadrat ist rot umrandet.

Die Gesamtzellzahl pro ml errechnet sich nach dem Mittelwert der pro Großquadrat gezählten Zellen, dem Kammerfaktor (für die verwendete Neubauerkammer = 10⁴) und dem Verdünnungsfaktor (bei einer 1:3 Verdünnung = 3), womit sich folgende Formel ergibt:

\[
\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}
\]  (1)

3.3 Bioreaktor

3.3.1 Aufbau des Bioreaktors

Das ursprüngliche Setup des Bioreaktors (Abbildung 3-8) geht auf die in unserer Arbeitsgruppe angefertigte Diplomarbeit „A New Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering“ von Anja Friedrich zurück [77].

3.3.2 Umbau zur Optimierung des Bioreaktors

Die Optimierung des BR wurde fortwährend umgesetzt. Im Zuge der ersten Experimente wurde deutlich, dass der Prototyp diverse Defizite aufwies, die nach und nach behoben werden konnten. Die notwendigen Änderungen am Bioreaktor sind im Ergebnisteil der Arbeit aufgeführt und gewährleisteten schließlich einen zuverlässigen Betrieb.

3.3.3 Sterilisation des Bioreaktors

Vor der Verwendung des BR zur Besiedlung von Scaffolds mit Zellen, mussten alle Komponenten, die mit Zellen oder mit Medium in Kontakt kommen sollten, sterilisiert werden (s. Abbildung 3-9).

Zur Sterilisation wurden die Komponenten doppelt in Folie eingeschweißt und anschließend Formaldehydgas bei 60 bis 70 °C für 7 h ausgesetzt.

Die Verifizierung der Sterilisation wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Anja Friedrich durchgeführt. Darüber hinaus war es, dank des verwendeten Materials Polymethylmethacrylate (PMMA) von Reservoir und Besiedlungszylinder, stets möglich, das Medium während eines Experiments im BR optisch zu überprüfen.
Material und Methoden

3.3.4 Druckmessung im Bioreaktor

Um den Fluss durch das Scaffold zu validieren, wurde mit freundlicher Unterstützung von Fabian König der Druck an verschiedenen Positionen im Bioreaktor gemessen. Für alle Messungen wurde der Druck-Transmitter CPT2500 (WIKA GmbH, Klingenberg, Germany) verwendet und die Daten mit der zugehörigen Software ausgewertet (USBsoft2500). Ein 3-Wege-Hahn (Discofix C, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde als Adapter verwendet, um den Sensor ohne Störung des laufenden Bioreaktors anschließen zu können. Der Sensor mit einem Messbereich von 0 bis 300 mmHg hatte eine Abweichung von ± 3 mmHg. Es wurde eine Aufnahme frequenz von 100 Hz eingestellt und über einen Zeitraum von 30 s gemessen, um Messfehler und zeitlich begrenzte Effekte zu unterbinden. Messungen wurden ohne Pulsation bei 10, 20, 40 und 100 dyn/cm² und unter pulsatilen Bedingungen bei 20, 40 und 100 dyn/cm² vorgenommen. Die Messdaten wurden mit der USBsoft2500 Software aufgezeichnet. Die abschließende Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und Visual Basic for Applications (VBA, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

3.3.5 Besiedlung verschiedener Scaffoldmaterialien


Abbildung 3-9: Überblick von sterilisierten Komponenten des BR; a: Besiedlungszyliner und Reservoir, b: Schläuche sowie diverse Adapter.


3.3.6 Besiedlung im Bioreaktor


Der Scaffoldhalter wurde in das Gehäuse geschoben und der Besiedlungszylinder mit FGM gefüllt. Anschließend wurden FB (750 000 Zellen/ cm²) in 2 ml Medium resuspendiert und über den in Flussrichtung vor dem Zylinder liegenden Anschluss in das Lumen des Scaffolds appliziert (vgl. Abbildung 3-12).
Material und Methoden

Abbildung 3-12: Darstellung des funktionsbereiten BR mit Mixer (1), Besiedlungzyylinder (2), Einspritzstelle für die Zellen (3), Reservoir (4) sowie der Steuerungseinheit (5) zur Rotation der Scaffolds.

Um eine Besiedlung auf der gesamten Scaffoldwand zu erreichen wurde der Besiedlungzyylinder auf dem Mixer für 7 h nach einem festgelegten Programm rotiert. Der Zylinder wurde hierbei für jeweils 20 sec in Uhrzeigerrichtung, und nach einer 20-minütigen Pause, für 30 sec gegen den Uhrzeigersinn rotiert. Die verschiedenen Zeiten stellten sicher, dass der Zylinder nach jeder Rotation an einer anderen Stelle zum Stillstand kam und so die Röhre vollständig besiedelt werden konnten.

3 Tage nach der Besiedlung mit FB wurde das FGM durch ECGM ersetzt. Anschließend wurde der Besiedlungsprozess mit EC auf die gleiche Weise wie mit dem FB wiederholt. Nach insgesamt 6 Tagen wurde der Versuch beendet und Proben für IHC und für REM (vgl. 3.4.1 und 3.4.2) genommen. Bei den Versuchen handelte es sich um 3-fach-Ansätze mit jeweils zwei besiedelten Scaffolds eines Materials pro Lauf, so dass insgesamt 6 Röhren pro Material besiedelt wurden.

3.3.7 Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor

Zunächst wurde ein Vorversuch zur Besiedlung unter Perfusion mit Polyurethan (n = 3) durchgeführt. Aufgrund der geringen Rauheit des Gefäßes und der geringen Reynolds-Zahl konnte laminarer Fluss angenommen werden:
Material und Methoden

Die Reynolds-Zahl (Re) basiert auf der gemittelten Geschwindigkeit des Fluids (\(v_m\)), dem Innendurchmesser der Röhre (d) und der Viskosität des Fluids (\(\nu\)).

\[
Re = \frac{v_m \times d}{\nu}
\]

(2)

Die gemittelte Geschwindigkeit vom Zellkulturmedium \(v_m\) ist definiert als die volumetrische Flussrate (\(\dot{v}\)) geteilt durch die Querschnittsfläche der Röhre (A).

\[
v_m = \frac{\dot{v}}{A}
\]

(3)

Der Innendurchmesser der PU-Röhre lag bei 6 mm. Für die Viskosität des Mediums wurde ein Wert von 1 mm\(^2\)/s gemessen. Somit lag Re zwischen 5 und 50. Turbulenzen im System treten aber erst ab einer Re > 2200 auf.

24 Stunden nach der FB-Besiedlung gemäß dem oben beschriebenen Protokoll zur Rotation des Besiedlungszylinders (s. Kapitel 3.3.6) wurde jede Röhre mit dem voreingestellten Volumenstrom von 18 ml/min für 2 Tage perfundiert. Nach der Besiedlung mit EC (750 000 Zellen/cm\(^2\)) wurden die Röhren erneut auf die gleiche Weise perfundiert. Nach insgesamt 6 Tagen wurden die besiedelten Röhren pulsatilem Fluss mit 60 bpm (engl.: beats per minute) ausgesetzt indem der Quetscher für 24 Stunden zugeschaltet wurde.

Da die Besiedlung der Scaffolds unzureichend war wurde die Perfusion im Weiteren auf den minimal möglichen Volumenstrom von 12,5 ml/min (Scherstress = 100 dyn/cm\(^2\)) gesenkt. Ansonsten wurde das Protokoll beibehalten.

Nach diesen vorläufigen Perfusionsexperimenten wurde eine Infusionspumpe (Infusomat fm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) für die weiteren Versuche verwendet, um den Fluss zu verringern. Darüber hinaus wurde der Besiedlungs- und Perfusionsprozess optimiert und verkürzt.

Beim ersten Versuch, wurden 24 h nach Einsaat der FB, welche Rotation aber keiner Perfusion ausgesetzt waren, die EC eingesät. 48 h nach Einsaat der EC startete die Perfusion mit 30 dyn/cm\(^2\) und nach insgesamt 7 Tagen wurde der Versuch beendet und Proben für die Auswertung mittels REM entnommen. Mangelhafte Besiedlungserfolge führten zu einer empirischen Testung und Anpassung des Protokolls.

Die Besiedlungsdauer mit Rotation wurde auf 6 Stunden reduziert und die Perfusionsdauer auf jeweils 42 für die FB bzw. 43 Stunden für die EC gesenkt. Die Zellen wurden einem geringeren Scherstress ausgesetzt, der darüber hinaus schrittweise wie in Abbildung 3-13 dargestellt, von 10 auf 40 dyn/cm\(^2\) (Flussmenge = 1,27 bis 5,1 ml/min, für PU) gesteigert wurde. Der Quetscher wurde jeweils 24 Stunden nach der Besiedlung mit FB bzw. EC zugeschaltet. Nach Abschluss der Besiedlung und Konditionierung wurden die besiedelten Röhren entnommen, in Stücke zerteilt und Proben für REM, IHC und PCR nach Protokoll (s. Kapitel 3.4) aufgearbeitet. Auch hier wurden jeweils 6 Röhren pro Material besiedelt.
**Abbildung 3-13**: Finales Flussprofil zur Konditionierung von TEVG. Nach der Besiedlung (rote Sterne) mit FB ($t = 0$ h) wurde der Scherstress stufenweise zunächst auf 10 dyn/ cm² ($t = 6$ h) und dann auf 20 dyn/ cm² ($t = 24$ h) erhöht. EC wurden bei $t = 48$ h ausgesät und ebenso wie die FB perfundiert. Die Pulsation startet (grüne Sterne) bei $t = 24$ h, wird zur Aussaat der EC gestoppt und startet erneut bei $t = 72$ h. Nach 96 h wird der Scherstress schließlich auf 40 dyn/ cm² erhöht und 1 h später die TEVG geerntet (gelber Stern)

### 3.4 Auswertungsmethoden

#### 3.4.1 Immunfärbung

Mit Hilfe der Immunfärbung können Gewebe-(Immunhistochemie) oder Zellkulturpräparate (Immunzytochemie, IC, engl.: Immunocytochemistry) hinsichtlich des Auftretens und der Lokalisation ausgesuchter Proteine untersucht werden.

Hierfür bedient man sich definiert der Antikörper, die an das Epitop des gesuchten Antigens binden und anschließend durch eine zuvor abgelaufene Farbreaktion und Auswertung am Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden können.

Es ist zwischen der direkten Methode und verschiedenen indirekten Nachweistechniken zu unterscheiden. Letztere können zu einer deutlichen Signalverstärkung beitragen.

#### 3.4.1.1 Immunzytochemie

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen wurden etwa 100 000 Zellen in 0,5 ml Medium resuspendiert und auf einem BD Falcon™ CultureSlide (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Hierbei handelt es sich um Glasobjektträger mit Kammer-Aufsätzen aus Kunststoff, die eine Kultivierung in kleinen, genau abgegrenzten Bereichen auf der Glasoberfläche ermöglichen. Bei Konfluenz der Zellen wurde das Medium dekantiert, die Zellen 2x mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend für 2 min mit eiskaltem Methanol / Aceton (1:1) (Pharmazie Klinikum Großhadern, München, Deutschland
und Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Die Lösung wurde entfernt und die Objektträger getrocknet. In Alufolie gewickelt konnten diese bei -20°C gelagert werden.

Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur (RT) wurden die Objektträger mit Aqua dest. (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) und anschließend mit PBS in einer Färbeschale mit Färbegestell aus Glas (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gespült. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation in \( \text{H}_2\text{O}_2 \) (1 ml 30%-ige Lösung auf 200 ml PBS, Vector Laboratories INC, California, USA) für 10 min in einer feuchten Kammer (Laborwerkstatt Großhadern, München, Deutschland). Nach einem Waschschritt in PBS-Brij (1 l PBS mit 1 ml BriJ 35-Lösung; Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers, verdünnt mit Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) auf die entsprechende Konzentration (s. Tabelle 3-1) für 30 min bei RT. Hierbei wurden die Fibroblasten auf TE7, alpha-Actin, SMC-Myosin, Collagen IV, Fibronektin und CD31 untersucht während bei den Endothelzellen Antikörper für CD31, VE-Cadherin sowie TE7 verwendet wurden.


Die Präparate wurden mit wässrigem Eindeckmedium (Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem Deckglas (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) eingedeckt und konnten nach der Trocknung am Mikroskop (Leica DMR microscope + Digital Cam DC 200 mit IM50 Software; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet werden. Für die Verwendung im Experiment war es ausschlaggebend, dass die jeweilige Zellkultur eine Reinheit von mindestens 95% aufwies.

### 3.4.1.2 Einbetten in Paraffin und Entparaffinierung der Gewebeproben und Scaffolds

Für die Färbung von Gewebepräparaten und besiedelten Scaffolds mussten diese zunächst in Paraffin eingebettet werden. Hierzu wurden die Proben unmittelbar nach der Ernte für mindestens 24 h in Formalin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, 4%-ig in PBS) eingelegt. Anschließend wurden die Präparate mit freundlicher Unterstützung des...
Zentrums für Neuropathologie und Prionenforschung der LMU nach folgendem Protokoll entwässert: 2 x 1 h in 70 % Ethanol, 3 x 1 h in 96 % Ethanol, 3 x 1 h in 100 % Ethanol, 2 x 1 h in 100 % Xylol (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), jeweils bei RT gefolgt von einem Paraffinbad für 2 x 2 h bei 60 °C. Bei den 25 Schichten dicken Polyurethanröhren wurde die Inkubation in Xylol auf 1 x 10 min reduziert, da sich das Material gegenüber Xylol für eine längere Inkubationsdauer nicht als ausreichend stabil erwies. Am folgenden Tag konnten die Proben in Paraffinblöckchen eingegossen und bei -20 °C gelagert werden. Von den Präparaten wurden am Schlittenmikrotom (Microm HM400R, Microm International, Walldorf, Deutschland) mit Schnellgefriereinrichtung (KS34, Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, diese ins Streckbad (Paraffin Tissue Floating Bath, Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg, Deutschland) überführt und anschließend auf Objekträger (Schubert & Weiss-OMNILAB GmbH & Co.KG, München, Deutschland) aufgebracht (vgl. Abbildung 3-14).
Material und Methoden

Abbildung 3-14: Arbeitsplatz zur Anfertigung von Paraffinschnitten (a) mit Kryotom (1), Paraffinblöckchen (2), KühlEinheit (3) und beheizbarem Wasserbad (4), sowie eine absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Präparate (b).

Zur Fixierung der Schnitte wurden diese zunächst über Nacht bei 36 °C im Wärmeschrank (Inkubator APT Line, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet. Bis zum Tag der Färbung konnten die Objektträger im Kühlschrank gelagert werden. Dann wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten zunächst für 30 min bei 50 °C in den Wärmeschrank gestellt. Die Entparaffinierung erfolgte als absteigende Alkoholreihe in dafür vorgesehenen Glasküvetten: 2 x 15 min Roti-Histol (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 2 x 5 min 100 % Ethanol, 2 x 5 min 96 % Ethanol, 2 x 70 % Ethanol (jeweils Apotheke Klinikum Grosshadern, München, Deutschland), 2 x 3 min Aqua dest. und 2 x 3 min PBS.
3.4.1.3  Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Durch das Einbetten in Paraffin kann es in den Präparaten zu Veränderungen des Epitops kommen, so dass dieses vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Deshalb erfolgt je nach verwendetem Antikörper eine Antigendemaskierung zur Wiederherstellung des Epitops. Zunächst wurde im Anschluss an die Entparaffinierung die Zellmembran durch eine 10-minütige Inkubation in PBS mit 0,5 % Triton-X (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) permeabilisiert. Zur Demaskierung wurde je nach Antikörper (s. Tabelle 3-1) eines der folgenden Verfahren verwendet:

Bei der Proteolyse wurden die Schnitte für 3 min bei RT in einer Lösung mit Proteinase (Endkonzentration 2,8 mU/ ml, Sigma Aldrich Chemie, GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in Aqua dest. inkubiert. Die Antigendemaskierung in einer Tris/EDTA-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit einem pH-Wert von 9,0 erfolgte für 10 Minuten in der Mikrowelle. Zunächst wurde die Lösung aufgekocht und dann zusammen mit den Schnitten weiter erwärmt. Vor dem nächsten Spülschritt musste die Lösung wieder auf ca. 40 °C abkühlen. Die Target Retrieval Solution (TRS, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem pH-Wert von 6,0 wurde ebenfalls erhitzt und die Schnitte anschließend für 15 Minuten in der Mikrowelle inkubiert. Schließlich wurde ein 0,1 mM EDTA-Puffer (EDTA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit einem pH-Wert von 8,0 in der gleichen Weise verwendet und die Schnitte für 10 Minuten in der Mikrowelle erhitzt.

Das weitere Vorgehen entspricht dem Protokoll der IC, wobei die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht (ü.N.) im Kühlschrank erfolgte. Hierdurch ergaben sich zum Teil andere Verdünnungen.
### Material und Methoden

**Tabelle 3-1:** Übersicht der Verdünnung und Hersteller der verwendeten Antikörper für IC, IHC für die Paraffinschnitte inklusive der dazugehörigen Demaskierungsverfahren und für die IHC an Kryoschnitten

<table>
<thead>
<tr>
<th>Antikörper</th>
<th>Verdünnung (IC, 1 h)</th>
<th>Verdünnung (IHC, ü.N.)</th>
<th>Hersteller</th>
<th>Demaskierung, nur für IHC</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>Zellkultur (IC) und Paraffinschnitte (IHC)</strong></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>anti-Collagen IV (COL-94)</td>
<td>1:600</td>
<td>1:600</td>
<td>Sigma</td>
<td>Proteolyse</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-Fibronectin (F3648)</td>
<td>1:3000</td>
<td>1:3000</td>
<td>Sigma</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>anti-ASMA (1A4)</td>
<td>1:100</td>
<td>1:80</td>
<td>Dako</td>
<td>Tris/ EDTA pH 9</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-CD 31 (JC70A)</td>
<td>1:20</td>
<td>1:30</td>
<td>Dianova</td>
<td>TRS pH 6</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-SMC-Myosin (SMMS-1)</td>
<td>1:50</td>
<td>1:40</td>
<td>Dako</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>anti-VE-Cadherin (TEA 1/31)</td>
<td>1:40</td>
<td>1:20</td>
<td>Beckman Coulter</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>anti-ICAM (MAB2130)</td>
<td>-</td>
<td>1:150</td>
<td>Chemicon</td>
<td>EDTA pH 8</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-TE7 (CBL271)</td>
<td>1:150</td>
<td>1:50</td>
<td>Millipore</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Kryoschnitte</strong></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>anti-Collagen IV (CIV 22)</td>
<td>-</td>
<td>1:600 (1 h)</td>
<td>Dako</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-ASMA (1A4)</td>
<td>-</td>
<td>1:300 (1 h)</td>
<td>Dako</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>anti-ED-A*-Fibronectin (IST9)</td>
<td>-</td>
<td>1:750 (1 h)</td>
<td>Santa Cruz</td>
<td>-</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**3.4.1.4 Anfertigung von Präparaten mittels Einfrieren und Schneiden am Kryotom**

Die Anfertigung und Färbung der Kryopräparate erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexander Berndt in der Pathologie Jena. Hierzu wurden nach

Der Versand erfolgte auf Trockeneis.

Die Präparate wurden am Kryotom (Leica CM 3050 S; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) mit einer Dicke von 3-5 µm geschnitten, auf SuperFrost®-Objekträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Die Verarbeitung von kryokonservierten PU-Proben war mit dieser Methode aufgrund der Materialbeschaffenheit und damit verbundenem Splittern des Materials beim Schneiden nicht möglich.

### 3.4.1.5 Hämalaun-Eosin-Färbung und Immunhistochemie an Kryoschnitten

Die Schnitte wurden langsam auf RT erwärmt und anschließend für 25 s in Methanol, dann für 8 min in eiskaltes Aceton getauucht. Die Schnitte wurden luftgetrocknet.

Hiernach erfolgte entweder eine Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) oder eine IHC auf die Marker Collagen IV, ASMA (engl.: *alpha smooth muscle actin*) oder ED-A+-Fibronectin (s. Tabelle 3-1).

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst in Aqua dest. gespült und dann für 20 min in Hämatoxylin (nach MEYER: 0,5 g Hämatoxylin ü. N. in 500 ml *Aqua dest.* lösen, dann 0,1 g Natriumjodat, 25 g Kalilaun, 25 g Chloralhydrat und 0,5 g Zitronensäure zugeben) inkubiert. Das Bläuen erfolgte nach kurzem Spülen mit Leitungswasser durch Inkubation für 10 min in Leitungswasser. Darauf folgte die Färbung mit Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) durch Eintauchen der Schnitte für 1 bis 3 Minuten gefolgt von mehreren Spülschritten in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 2 x *Aqua dest.*, 50 %, 70 %, 2 x 96 %, 100 % EtOH. Abschließend wurde jeweils für 2 min in 100 % EtOH, einem EtOH/ Xylol-Gemisch (1:1) und Xylol inkubiert und die Proben mit Pertex (Histolab Products AB, Göteborg, Schweden) eingedeckt.

Bei der IHC wurden die Schnitte zunächst zur Permeabilisierung und im Folgenden zwischen sämtlichen Inkubationsschritten 3 x mit TBS-Tween (2,25 g Tris-HCl, 17,125 g Tris-Base, 21,95 g NaCl in 2,5 l *Aqua dest.*, 2,5 ml Tween; sämtliche Reagenzien von Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gespült.

Da der Nachweis des primären Antikörpers über die Streptavidin-Biotin-Methode erfolgte, wurde das endogene Biotin durch Inkubation mit Avidin für 10 min und anschließend mit Biotin
für weitere 10 min in der feuchten Kammer blockiert. Die Inkubationsdauer der primären Antikörper betrug 1 h bei RT.


Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte an dem Lichtmikroskop Axiophot 2 MOT (Kamera: Axiocam HRc; Software: Axiovision Rel. 4.6; Zeiss, Deutschland).

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit den Elektronen des betrachteten Präparates genutzt um ein Bild der Oberfläche des zu untersuchenden Objektes mit einer sehr hohen Schärfe und Tiefe zu erzeugen.

Die Proben wurden für diese Untersuchungsmethode nach Abschluss des Versuches mindestens 24 h in FIX II-Lösung im Kühlschrank gelagert. Für die Lösung wurden 0,75 ml 1 N HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 43 ml 25%-ige Glutaraldehydlösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 5,65 g Natriumkakodylat Trihydrat (Na-CaCO₃, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) vermischt und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 96 %) jeweils 10 min inkubierte und daraufhin in eiskaltem 99%-igen, unvergälltem Ethanol für maximal 1 h gelagert. Die Proben wurden in die Kammer des Kritischen-Punkt-Trockners (CPD 30, Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Deutschland) überführt und der Austausch des Alkohols gegen CO₂ erfolgte schrittweise bei 8 °C. Darauf folgte die Erwärmung des CO₂. Bei 42 °C und einem Druck von 80 bar wurde die Entlüftung der Gaskammer gestartet. Um die Proben nicht zu beschädigen, wurde das Ventil nur leicht geöffnet und die Kammer über einen Zeitraum von etwa 30 min entlüftet.

Die trockenen Proben wurden aus der Kammer entnommen, zerteilt und jeweils die Ober- und die Unterseite mit adhäsiven Carbonplättchen (Carbon Adhesive Leit-Tabs Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) auf die Probenteller (Specimen stubs, 12,5 mm Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Deutschland) geklebt. Die Proben wurden in das Sputtergerät (Sputter
Coater, SCD 50, Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Deutschland) eingebracht und in einer Argon-
Atmosphäre für 180 s bei $10^{-5}$ mbar mit Gold beschichtet.
Die Auswertung erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop (EVO® LS 10; Carl Zeiss
MikroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 500- und bei 1000-facher Vergrößerung.

3.4.3 RNA-Expressionsuntersuchung

3.4.3.1 RNA-Isolation
Die Isolation der RNA (Ribonukleinsäure) von den besiedelten Gefäßen nach Perfusion und
Pulsation sowie der nativen Gefäßstücke erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen
GmbH, Hilden, Deutschland)
Hierbei handelt es sich um ein säulenbasiertes Aufreinigungssystem, bei dem die RNA an die
Membran der Säule gebunden, mehrfach gewaschen und schließlich mit Wasser eluiert wird.
Hierfür wurden die besiedelten Gefäße in flüssigen Stickstoff getaucht, in
ebenfalls gekühlte Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die Proben wurden in
15 ml Falcons überführt und mit 600 µl Lysepuffer gründlich gevortext (Vortex-Mixer, MS1 Mini
shaker; IKA Works, Staufen, Deutschland). Anschließend wurde mit einer Spritze mit Kanüle
der Lysepuffer mehrfach mit starkem Druck in das Lumen der Scaffolds gespritzt, um noch
anhaftende Zellen zu lösen. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000 U/min, 3 min) wurde die
Flüssigkeit abgenommen und auf eine QIAshredder-Säule gegeben. Durch Zentrifugation für
2 min bei maximaler Geschwindigkeit wurden letzte Zellbestandteile aufgeschlossen und
abgetrennt.
Das Eluat wurde mit der gleichen Menge (600 µl) 70 % Ethanol versetzt, gründlich gemischt,
auf die Affinitäts säule (RNeasy spin column) aufgetragen und für 15 sec bei 8000 g
zentrifugiert. Das Eluat konnte verworfen und die an die Membran gebundene RNA in
mehreren Waschschritten gereinigt werden.
Schließlich wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst und die
Ausbeute sowie Reinheit der eluierten RNA durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm
am UV/Vis-Spektrometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überprüft. Die
Ribonukleinsäure wurde bei -80 °C gelagert.

3.4.3.2 Reverse Transkription
Die gewonnene RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH,
Hilden, Deutschland) in cDNA transkribiert. Hierzu wurden die Proben mit RNAsa-freiem
Wasser auf 666 ng RNA/ Ansatz verdünnt und anschließend nach Herstellerangaben
aufgearbeitet.
3.4.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Bei der real-time PCR wird sich des Zusammenhangs zwischen Anfangsmenge des Templates und der Menge an PCR Produkt in jedem einzelnen Zyklus der PCR Reaktion bedient, der sich durch die Gleichung $x = 2^n$ beschreiben lässt, wobei die eingesetzte Ausgangsmenge an Template gleich 1 und $x$ die Menge des PCR Produktes nach $n$ Zyklen ist. Dieser Zusammenhang ist allerdings lediglich in der exponentiellen Phase der PCR gegeben, weshalb die Menge an gebildetem Template kontinuierlich gemessen werden muss. Dies erfolgt mit Hilfe des Zusatzes von SYBR-Green zum PCR Ansatz. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und verändert dabei sein Fluoreszenzspektrum. Im Anschluss der Elongationsphase der PCR wird die Intensität der SYBR-Green Fluoreszenz, welche mit zunehmender DNA Menge steigt, gemessen und im Amplifikationsplot über der Zykluszahl aufgetragen.

Hieraus wird für das Zielgen und für ein sogenanntes Haushaltsgen der spezifische CT-Wert für die jeweilige Probe erhalten. Haushaltsgene sind in allen Zellen in sehr großen Mengen vorhanden und werden durch unterschiedliche Behandlung der Zellen während eines Experiments in ihrer Expressionsstärke nicht beeinflusst. Hierüber wird für jede Probe der normalisierte $\Delta$CT-Wert über folgende Gleichung ermittelt:

$$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Haushaltsgen}$$  \hspace{1cm} (4)

Der normalisierte CT-Wert der behandelten Probe ($\Delta CT$) muss anschließend mit der Referenz verglichen werden und liefert mit $\Delta\Delta CT$ die Zykluszahl $n$.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{ref} - \Delta CT_{beh}$$  \hspace{1cm} (5)

Daraus ergibt sich die relative Erhöhung oder Verringerung der Expression des Zielgens der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Für die Quantifizierung der Expressionslevel wurde das „QuantiFast SYBR Green PCR Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben für die real-time RT-PCR verwendet. Ebenso wurden die folgenden Primer käuflich erworben: GAPDH, IL1α, IL-6, IL-8, MCP1 und VCAM1 (QuantiTect Primer Assay; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).
4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Scaffoldmaterialien

4.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die vier verschiedenen Scaffoldmaterialien zur Herstellung eines TEVG wurden zunächst mittels REM analysiert (Abbildung 4-1). Es wurden deutliche Unterschiede in der Oberflächenstruktur von PU, Collagen, dezellulärisierten humanen Venen und BC erkannt. Zudem erfolgte ein Vergleich mit nativem Venenmaterial:

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Oberfläche innen</th>
<th>Oberfläche außen</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>PU</td>
<td><img src="image" alt="PU a" /></td>
<td><img src="image" alt="PU b" /></td>
</tr>
<tr>
<td>Collagen</td>
<td><img src="image" alt="Collagen c" /></td>
<td><img src="image" alt="Collagen d" /></td>
</tr>
<tr>
<td>Dezell</td>
<td><img src="image" alt="Dezell e" /></td>
<td><img src="image" alt="Dezell f" /></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Abbildung 4-1: REM-Bilder der Scaffoldmaterialien

- PU: Polyurethan
- Collagen: Kollagen
- Dezell: Dezellulärisierte Vene
Ergebnisse

Abbildung 4-1: REM-Aufnahmen der 4 verwendeten Scaffoldmaterialien (a bis h) vor Besiedlung von innen (links) und außen (rechts), sowie von einer nativen Vene (i, j). Durch die Aufnahmen werden deutliche Strukturunterschiede zwischen PU (a, b), Collagen (c, d), dezellularisierten Venen (e, f) und Röhren aus BC (g, h) sichtbar. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

4.1.2 Immunhistochemie
Um sicher zu stellen, dass die dezellularisierten Venen tatsächlich zellfrei sind, wurde eine unbesiedelte dezellularisierte Vene immunhistochemisch gefärbt.

Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbung einer dezellularisierten Vene gegen CD31 (a) und TE7 (b). Vereinzelt sind positive Markierungen für CD31 im tiefer gelegenen Gewebe zu finden (s. Kreis), während TE7 sowohl vereinzelt auf der luminalen Seite (s. Pfeile) als auch in den tiefer gelegenen Schichten der Vene (s. unterhalb der Sterne) detektierbar ist.

Während für CD31 keine positive Markierung auf der luminalen Seite des Gefäßes zu finden ist, sind vereinzelt positive Markierungen im tiefer gelegenen Gewebe zu sehen (s. Kreis in Abbildung 4-2). Die Färbung für TE7 ist partiell vorhanden, insbesondere in den tieferen Schichten des Gefäßes (s. Sterne), aber auch an der Innenwand des Gefäßes (s. Pfeile). Es sind jedoch keine Zellkerne erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Vene zellfrei ist.

4.2 Qualifizierung der Zellen
Um die Qualität der isolierten Zellen zu überprüfen, die zur Besiedlung der Scaffoldmaterialien mit Hilfe des BR dienen sollten, wurden diese vor der Kryokonservierung auf Multi-well-Objekträgern ausgesät und auf die unter Tabelle 3-1 aufgeführten Marker untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 4-3 die Färbungen für FB und EC dargestellt. Es wurden nur Zellen verwendet, die die zelltypischen Marker und eine Reinheit von mindestens 95 % aufwiesen.
**Ergebnisse**

**Abbildung 4-3:** Immunzytochemische Färbung von FB (a-f) und EC (g-i). FB sind positiv für die Marker TE7 (a), Fibronektin (e) und ASMA (f). Eine Schwache Positivität liegt für Collagen IV (c) und SMC-Myosin (d) vor. Die EC hingegen sind negativ für TE7 (g) und positiv für CD31 (h). Eine schwach positive Markierung liegt für VE-Cadherin in EC (i) vor. Maßstabsbalken: a, b, g und h: 100 µm, c bis f und i: 50 µm

Die FB wiesen für TE7 eine positive und für CD31 eine negative Markierung auf, während die EC positiv für CD31 waren, nicht aber für TE7. Weiterhin waren die FB sehr schwach positiv für Collagen IV. Vereinzelt positive Markierungen für SMC-Myosin indizieren eine schwache Kontamination mit glatten Muskelzellen, welche für die durchgeführten Experimente jedoch nicht bedenklich waren. Darüber hinaus wiesen die FB eine starke Markierung für Fibronektin auf sowie bei ca. einem Viertel der Zellen eine starke Positivität für ASMA. Die Endothelzellen wiesen im Weiteren positive Markierungen für VE-Cadherin auf.

### 4.3 Umbaumaßnahmen am Bioreaktor

Nach der Untersuchung der Scaffoldmaterialien (Kapitel 4.1) und der für die Besiedlung zu verwendenden FB und EC kam der unter 3.3 beschriebene BR zum Einsatz. Bei der Verwendung des BR hatte sich schnell gezeigt, dass er, trotz der sehr guten zugrunde liegenden Überlegungen, nicht voll einsatzfähig war. Es handelte sich hierbei um einen Prototypen, dessen Testung sich auf eine Befüllung bei RT und normaler Luftfeuchtigkeit beschränkte. Darüber hinaus wurde die Rotation und Dichtigkeit des Besiedlungszylinders getestet. Eine Assemblierung der einzelnen Komponenten war jedoch nicht erfolgt und somit war auch der Betrieb bei eingeschalteter Pumpe noch nicht getestet worden.
Die in der Arbeit von Anja Friedrich getroffenen Aussagen, dass mit dem vorliegenden Bioreaktor die sterile Produktion von zwei TEVG durch simultane dynamische Besiedlung und Konditionierung unter physiologischen Bedingungen möglich sein solle [77], trafen nur bedingt zu. Im Folgenden sollen die unternommenen Schritte zur Optimierung des BR für diese Anwendung dargestellt werden (Kapitel 4.3.1 bis 4.3.5).

4.3.1 Sterilität


Abbildung 4-4: Durch Undichtigkeiten am BR konnte Feuchtigkeit zwischen die Bodenplatte und die angeschraubten Komponenten gelangen, was zur Korrosion führte.


**Abbildung 4-5:** Querschnitt (a) und Aufsicht (b) des Besiedlungszylinders, bestehend aus einem zylinderförmigen Gehäuse (1) mit Schraubdeckel (2). Der Scaffoldhalter verfügt über einen Auslass (3) und einen Einlass (4) die mit 4 Stäben (5) adjustiert werden können. Die zwei simultan perfundierbaren TEVG (6) werden mit Gefäßkanülen (7) fixiert während die Stäbe mit Muttern aus Teflon (8) befestigt werden. Luer-Lock-Adapter (9) ermöglichen eine einfache Handhabung zur Befüllung des Zylinders und zur Verbindung mit dem Schlauchsystem (aus [82]).

### 4.3.2 Parallele Besiedlung von zwei TEVGs

Um wie geplant die simultane Prozessierung von zwei TEVGs zu bewerkstelligen, mussten andere Gefäßkanülen verwendet werden. Die ursprünglich geplanten Adapter (Abbildung 4-6, oben) erlaubten nur eine Besiedlung von ca. 1 cm der 6 cm langen Scaffolds auch im voll ausgefahrenen Modus, so dass kürzere Kanülen eingesetzt werden mussten (Abbildung 4-6, unten).

**Abbildung 4-6:** Darstellung des ursprünglich angedachten Adapters zur Befestigung der Venen im Besiedlungszylinder (oben, Surge Cardiovascular, Bild von www.surgecardiovascular.com) gegenüber dem schließlich verwendeten Adapter (unten, Vieweg Dosier- und Mischtechnik, Bild von www.dosieren.de).
4.3.3 Dynamische Besiedlungsbedingungen

Zur dynamischen Besiedlung der TEVG war die programmierbare Rotationsfunktion des Besiedlungszyllinders vorgesehen. Während die Rotation bei RT und geringer Luftfeuchtigkeit problemlos funktionierte, war dies im Brutschrank, insbesondere mit angeschlossenen Schläuchen, trotz rotierbarer Anschlüsse nicht der Fall.

Durch die Feuchtigkeit wurde die Reibung zwischen Zylinder und Gummiauflagen auf den rotierenden Walzen zu schwach. Darüber hinaus sorgten die Feuchtigkeit und kleine Leckagen am BR dafür, dass die Nadellager der Walzen verkalkten. Dies führte bei der hinteren Walze, welche nicht mit einem Keilriemen verbunden war und nur passiv über die Rotation des Zylinders angetrieben werden sollte, zum Stillstand und blockierte schließlich auch den Besiedlungszyllinder.

Es wurden daraufhin andere Lager, beidseitig geschlossene Kugellager, eingesetzt. Außerdem wurde der Besiedlungszyllinder im Folgenden bereits am Tag vor der Besiedlung mit Medium befüllt und im Brutschrank vorinkubiert. Das sich durch den Temperaturunterschied bildende Kondenswasser konnte anschließend vor dem Aufsetzen auf den Mixer abgewischt werden, wodurch die Reibungsverluste reduziert wurden. Diese Maßnahmen behoben das Problem jedoch nicht vollständig.

Eine weitere Überlegung war, den Druck des Zylinders auf die Walzen, und so die Reibung, zu erhöhen. Manuelle Tests zeigten, dass dieser Druck sehr exakt justiert werden musste um nicht ein erneutes Blockieren durch zu starken Druck zu verursachen oder durch zu schwachen Druck keinen Effekt zu erzielen. Somit wurde dieser Ansatz verworfen. Schließlich wurde die hintere Walze über einen weiteren Keilriemen mit der vorderen Walze verbunden (Abbildung 4-7), um so die Kraft auf beide Walzen zu übertragen. Die durch die hintere Walze verursachte Schwergängigkeit wurde behoben und die Rotation funktionierte zuverlässig.
4.3.4 Konditionierung der TEVGs und Austausch der Pumpe

Die Konditionierung der Zellen sollte durch einen kontinuierlichen Medienstrom sowie durch einen regelmäßig gesetzten Puls erfolgen. Hierfür besaß der BR eine Rollerpumpe sowie einen Pulser, welcher den Schlauch unmittelbar vor dem Besiedlungszylinder in regelmäßigen zeitlichen Abständen abklemmte.


Auch die verwendete Rollerpumpe erzeugte einen Puls, welcher aber sehr gering ausfiel (vgl. Abbildung 4-8), womit sich der Nutzen des Pulser bestätigte.

Abbildung 4-7: Isometrische Darstellung des Aufbaus des Bioreaktors mit Hinweis auf die notwendigen Umbaumaßnahmen für einen fehlerfreien Betrieb des BR
Ergebnisse

Abbildung 4-8: Messung der Druckverhältnisse im BR am Luer-Lock-Anschluss zum Scaffold bei einer Perfusion mit 12 ml/min. Durch die Verwendung des Pulser ergeben sich starke Druckunterschiede (rot), während ohne Einsatz des Pulser nur sehr geringe Druckschwankungen auftreten (blau). Die Druckkurve mit Pulser erinnert an Systole und Diastole unter physiologischen Bedingungen.

Der eingesetzte Medienstrom von wenigstens 12,5 ml/min hingegen erwies sich als zu stark für die Konditionierung, da die Zellen nicht ausreichend verankert waren und durch den starken Scherstress abgelöst wurden (vgl. Kapitel 4.5).

Im Datenblatt der Pumpe wird angegeben, dass diese je nach Schlauchdurchmesser mindestens 10 ml/min pumpen. Eine manuelle Messung des Durchflusses ergab beim kleinsten einzustellenden Durchfluss einen Wert von 12,5 ml/min (750 ml/h), was einem Wert von 100 dyn/cm² entspricht. In der Literatur [37], [83], [84] werden für kleine Gefäße und auch für die Entwicklung von TEVG deutlich niedrigere Werte angegeben.

Abbildung 4-9: Verbindung des BR mit einem Infusomat an Stelle der ursprünglich verwendeten Pumpe von Welco. Der Aufbau des BR in der Sterilwerkbank (a) erfolgte wie mit der anderen Pumpe. Um die Schläuche nicht in der Dichtung des Brutschanks abzuklemmen, wurden an der Tür Abstandshalter (siehe Kreise, b) installiert.

Um einen geringeren Medienstrom zu erreichen, wurde schließlich ein Infusomat anstelle der bisherigen Pumpe an den BR angeschlossen (Abbildung 4-9). Hiermit ließen sich geringere Werte einstellen. Es wurde hierdurch allerdings der Vorteil aufgehoben, dass der gesamte BR komplett im Brutschrank unterzubringen ist.
Für die Testung des BR war dieser Aufbau ausreichend, im Folgenden sollte aber eine passende Pumpe implementiert werden (s. Kapitel 5.1).

### 4.3.5 Vereinfachtes Handling


![Abbildung 4-10: Finale Verbindung der einzelnen Komponenten des BR mit Schläuchen unter Verwendung der ursprünglichen Pumpe. Neben den hier sichtbaren 3-Wege-Hähnen (Pfeile) wurden die roten Verschlusskappen am Besiedlungszylinder auch durch 3-Wege-Hähne ersetzt (Sterne), was das Befüllen und Entlüften deutlich vereinfachte.](image)

Des Weiteren war das Einfügen des Scaffoldhalters in den Besiedlungszylinder äußerst schwergängig. Hierfür wurde der Zylinder minimal aufgefräst, so dass er dicht blieb, aber das Zusammenstecken und Zerlegen erleichtert wurde.
4.4 Besiedlungsversuche ohne Fluss

4.4.1 Polyurethan

Da PU bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe in Form von Herzklappen besiedelt wurde, wurden keine entsprechenden Vorversuche ohne BR durchgeführt. Stattdessen wurde direkt der BR verwendet und die PU-Röhre mit einer Zellzahl von 750 000 Zellen/ cm² besiedelt. Exemplarisch sind in Abbildung 4-11 Bilder von im BR besiedelten PU-Röhren dargestellt.

<table>
<thead>
<tr>
<th>REM</th>
<th>IHC auf TE7</th>
<th>IHC auf CD31</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><img src="image1.png" alt="image" /></td>
<td><img src="image2.png" alt="image" /></td>
<td><img src="image3.png" alt="image" /></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Abbildung 4-11**: REM-Aufnahmen (a) und immunhistochemische Färbungen (b, c) der besiedelten PU-Röhren. PU war im Bioreaktor ohne Fluss gut zu besiedeln, es zeigte sich aber, dass die Zellschicht wenig adhärent war und die EC keinen pfastersteinförmigen Monolayer ausbildeten. Auch lösten sich die Zellen teilweise vom Scaffold. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).


4.4.1.1 Verschiedene Schichtdicken von PU

Da im Laufe der Arbeit erkannt wurde, dass die PU-Röhren mit 80 Schichten wenig flexibel und nachgiebig sind und so von einer geringen Compliance ausgegangen werden muss, wurden weitere PU-Scaffolds mit weniger Schichten (5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35) sowohl unbiesiedelt, als auch mit Zellen besiedelt mittels REM untersucht, und das Handling damit überprüft.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Schichten</th>
<th>Unbesiedeltes PU</th>
<th>PU mit FB</th>
<th>PU mit FB und EC</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>5 Schichten</td>
<td><img src="image1" alt="a" /></td>
<td><img src="image2" alt="b" /></td>
<td><img src="image3" alt="c" /></td>
</tr>
<tr>
<td>10 Schichten</td>
<td><img src="image4" alt="d" /></td>
<td><img src="image5" alt="e" /></td>
<td><img src="image6" alt="f" /></td>
</tr>
<tr>
<td>15 Schichten</td>
<td><img src="image7" alt="g" /></td>
<td><img src="image8" alt="h" /></td>
<td><img src="image9" alt="i" /></td>
</tr>
<tr>
<td>20 Schichten</td>
<td><img src="image10" alt="j" /></td>
<td><img src="image11" alt="k" /></td>
<td><img src="image12" alt="l" /></td>
</tr>
<tr>
<td>25 Schichten</td>
<td><img src="image13" alt="m" /></td>
<td><img src="image14" alt="n" /></td>
<td><img src="image15" alt="o" /></td>
</tr>
<tr>
<td>30 Schichten</td>
<td><img src="image16" alt="p" /></td>
<td><img src="image17" alt="q" /></td>
<td><img src="image18" alt="r" /></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Ergebnisse


Es zeigte sich, dass das PU unabhängig von der Schichtdicke eine vergleichbare Struktur aufwies (Abbildung 4-12, links) und darüber hinaus ausgezeichnet sowohl mit FB (Mitte) als auch mit FB und EC (rechts) zu besiedeln war.


4.4.2 Collagen

Zu Beginn der Untersuchungen wurden Collagen Cell Carrier (CCC) mit FB besiedelt. REM-Aufnahmen (Abbildung 4-13) deuten darauf hin, dass die Zellen eine Vorzugsrichtung aufweisen und eine eher spindelförmige Morphologie annehmen. Dies entspricht mehr den FB in vivo als die sonst übliche Gestalt von auf Plastik kultivierten Zellen.


Im weiteren Verlauf wurden 3 x 2 Collagen-Röhren im BR ohne Fluss besiedelt. Nach der adäquaten Besiedlung der CCC war der Besiedlungserfolg bei den Collagen-Röhren nicht zufriedenstellend. Für REM-Aufnahmen wurde die besiedelte Röhre aufgeschnitten und auseinander gebogen, um Aufnahmen vom Lumen machen zu können. Hierbei platzierte beim
Ergebnisse

ersten Versuch die Zellschicht ab (Abbildung 4-14, a, Übersichtsbild). Doch auch in den weiteren Versuchen wurde keine vollständige Besiedlung der Collagenröhren erreicht (Abbildung 4-14, d und g). Die Ergebnisse wurden durch die IHC bestätigt. Eine Markierung mit TE7 ist nur vereinzelt bei Versuch 2 (Abbildung 4-14, e) auszumachen, während CD31 zumindest in Versuch 3 (Abbildung 4-14, i) stark nachweisbar ist und auf eine adäquate Besiedlung mit EC hinweist. Darüber hinaus war das Collagen sehr fragil und riss leicht (vgl. Abbildung 4-14, h und i).

<table>
<thead>
<tr>
<th>REM</th>
<th>IHC auf TE7</th>
<th>IHC auf CD31</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>a</td>
<td>b</td>
<td>c</td>
</tr>
<tr>
<td>d</td>
<td>e</td>
<td>f</td>
</tr>
<tr>
<td>g</td>
<td>h</td>
<td>i</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Abbildung 4-14: REM-Aufnahmen (a, d und g) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f, h, i) von besiedelten Collagen-Röhren in 3 verschiedenen Versuchsdurchläufen (1 = a-c, 2 = d-f, 3 = g-i). Die Besiedlung erwies sich in allen Versuchen als unvollständig. Darüber hinaus zeichnete sich das Material durch eine geringe Reißfestigkeit aus und konnte schnell beschädigt werden. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

4.4.3 Humane dezellularisierte Venen

Da von den dezellularisierten Venen nur begrenzt Material zur Verfügung stand, wurden die Röhren direkt mit dem BR verwendet. Auch hier handelte es sich wiederum um einen 3-fach-Ansatz mit jeweils 2 besiedelten Röhren pro Lauf.
Ergebnisse

<table>
<thead>
<tr>
<th>REM</th>
<th>IHC auf TE7</th>
<th>IHC auf CD31</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>a, d</td>
<td>b, c, e, f</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Abbildung 4-15: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von im BR rebesiedelten dezellularisierten Venen. Es ist ein Beispiel für einen verhältnismäßig guten Besiedlungserfolg der dezellularisierten Vene (a-c), sowie für eine schlecht bis gar nicht besiedelte Vene (e-f) dargestellt. Der Zellverband löste sich allerdings auch bei der gut besiedelten Vene im Laufe der Präparation wieder ab (vgl. b, c). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).


4.4.4 Bakterielle Cellulose

Vergangene Untersuchungen mit BC des Herstellers Xellutec innerhalb der Arbeitsgruppe hatten wenig Besiedlungserfolg gezeigt (unveröffentlichte Daten). Da der Hersteller aber seinen Herstellungsprozess optimiert hatte, wurde zunächst die prinzipielle Besiedelbarkeit anhand von Patch und Röhre überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl auf den Patchen (Abbildung 4-16, oben), als auch auf den aufgeschnittenen Röhren (Abbildung 4-16, unten) Zellen adhärierten.
Ergebnisse

<table>
<thead>
<tr>
<th>REM</th>
<th>IHC auf TE7</th>
<th>IHC auf CD31</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><img src="image.png" alt="a" /></td>
<td><img src="image.png" alt="b" /></td>
<td><img src="image.png" alt="c" /></td>
</tr>
<tr>
<td><img src="image.png" alt="d" /></td>
<td><img src="image.png" alt="e" /></td>
<td><img src="image.png" alt="f" /></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Abbildung 4-16:** REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von besiedelter BC. Die Besiedlung war sowohl in Form eines Patches (a - c), als auch in Form der Röhre (d bis f) möglich. Es bildeten sich geschlossene Monolayer, welche bei den aufgeschnittenen Röhren aber durch die Probenvorbereitung fürs REM Risse bekamen (siehe d). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Es fand keine Invasion der Zellen in das Material hinein statt. Dafür war in der IHC zu erkennen, dass sich die FB und EC ausschließlich als Monolayer auf der BC anlagerten.


**4.5 Etablierung des Perfusionsprotokolls**

Nachdem die zur Besiedlung geeigneten Scaffoldmaterialien ermittelt waren, wurde das Perfusionsprotokoll zur Konditionierung der Zellen etabliert. Hierfür wurden die PU-Röhren verwendet, da diese sowohl in größerem Umfang vorhanden waren und reproduzierbare Ergebnisse geliefert hatten.

Die erste Besiedlung mit Perfusion zeigte mangelhaften Erfolg. Die REM-Aufnahmen zeigten maßgeblich das native Material und vereinzelt abgerissene Zellflächen (Abbildung 4-17, a). Es war anzunehmen, dass der Durchfluss von 18 ml/ min, welcher von der Pumpe zu Beginn generiert wurde, zu stark war. Es folgten Versuche mit geringerem Fluss, welcher sich aber mit 12,5 ml/ min weiterhin als zu hoch herausstellte.
Zellen blieben nur an vereinzelten Stellen des Scaffolds haften und waren in Flussrichtung ausgerichtet (Abbildung 4-17, b).

**Abbildung 4-17:** REM-Aufnahmen der unter Fluss besiedelten PU-Röhren. Während bei hohem Fluss mit 18 ml/min (a) keine Zellen am Material adhärieren konnten, blieben beim minimal einstellbaren Fluss von 12,5 ml/min (b) vereinzelt Zellen am Scaffold haften und wiesen eine starke Ausrichtung in Flussrichtung (s. Pfeil) auf. Vergrößerung: 1000-fach (grobes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Zum Zweck der Besiedlung von Gefäßprothesen mit Zellen war der BR mit dem ursprünglichen Setup (mit Welco-Pumpe statt Infusomat, vgl. Kapitel 4.3.4) nicht zu verwenden, so dass die in Kapitel 4.3 beschriebenen Umbaumaßnahmen durchgeführt wurden. Auch mit dem im Klinikbetrieb gebräuchlichen Infusomat wurden verschiedene Flüsse, basierend auf Werten aus der Literatur [37], [83], [84], ausgetestet. Beim ersten Versuch erfolgte noch keine Konditionierung der FB allein. Der maximale Scherstress betrug 30 dyn/cm² und die Pulsation wurde 48 h nach der EC-Aussaat gestartet. Die gesamte Versuchsduer betrug 7 d. Bei der Aussaat der EC 24 h nach der Besiedlung mit FB, wurde aus einem der besiedelten Scaffolds eine Röhre von FB ausgespült, welche in Abbildung 4-18 (a) dargestellt ist. Es handelt sich um mehrere Lagen von FB welche in Form einer Röhre fusioniert sind und offenbar keine ausreichende Adhärenz am Scaffold ausgebildet hatten, was zur Ablösung während des Einspritzens der EC führte. Auch wurde angenommen, dass die Einsaat von EC bereits 24 h nach Besiedlung des Scaffolds mit FB, zu früh war.

Zudem schien die Nährstoffversorgung der Zellen nicht über den gesamten Versuchszeitraum ausreichend zu sein, da die Zellen bei der Ernte des TEVG bereits wieder abstarrten (vgl. Abbildung 4-18, b). Die bereits stark gelbliche Farbe des Mediums war ein weiterer Indikator für eine Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen. Schließlich war die Pumpe mehrfach durch die Bildung von Luftblasen im Schlauchsystem stehen geblieben, so dass kein kontinuierlicher Scherstress generiert werden konnte und die Konditionierung der EC unvollständig war. Dies wurde in weiteren Versuchen durch Abziehen der Luft über einen der verwendeten 3-Wege-Hähne (Abbildung 4-10) behoben.


In nachfolgenden Untersuchungen wurden somit auch die FB Scherstress ausgesetzt, und die Besiedlung mit EC erfolgte erst nach 48 statt nach 24 h. Die gesamte Versuchsdauer wurde auf 5 d reduziert. Die Perfusion wurde 18 h nach der Besiedlung mit einem Scherstress von 10 dyn/ cm² gestartet, sowohl für die FB, als auch für die EC. Der maximale Scherstress wurde mit 40 dyn/ cm² 1 h vor Ende des Versuchs festgelegt.

Mit diesem Setup wurde eine glatte und kompakte Zellschicht generiert (Abbildung 4-19, a).


Teilweise traten Risse im Zellverband auf (Abbildung 4-19, b). Hierbei handelt es sich wieder um durch die Präparation entstandene Artefakte. Die Zellschicht wurde teilweise beim Öffnen
und Auseinanderklappen der Röhre zerrissen. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen ohne weiteren Einfluss auf die Röhre einen intakten und vollständigen Zellrasen ausgebildet haben. Durch den etwas erhöhten Fluss (von 30 auf 40 dyn/ cm²) scheinen die Zellen stärker abgeflacht zu sein, als dies beim ersten Versuch der Fall war. Eine Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung ist bei diesem Versuchslauf nicht erkennbar.

Im Weiteren wurde angestrebt den Effekt von höherem Scherstress auf die Zellen zu überprüfen. Deshalb wurde der maximale Scherstress auf 70 dyn/ cm² für 1 h erhöht. Außerdem wurde der Scherstress sukzessive (von 10 über 20 auf 40 und schließlich auf 70 dyn/ cm²) erhöht. Das Ergebnis war weniger zufriedenstellend als beim Versuch mit max. 40 dyn/ cm². Die präparationsbedingten Risse traten vermehrt auf, und die Oberfläche war nicht so ebenmäßig wie im vorherigen Versuch. Vereinzelt scheinen Zellen vom Untergrund abgelöst worden zu sein (Abbildung 4-20, b).

**Abbildung 4-20:** REM-Aufnahmen von besiedelten PU-Röhren nach einem Protokoll mit einem maximalen Scherstress von 70 dyn/ cm². Dies resultierte in einer weniger stabilen Besiedlung als der vorherige Versuch mit 40 dyn/cm² (Abbildung 4-19). Es bildeten sich vermehrt Risse im Zuge der Präparation (a) und vereinzelt schienen sich Zellen wieder vom Zellverband abzulösen (b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Final wurde somit für alle weiteren Versuche das oben genannte Protokoll (Kapitel 3.3.7) festgelegt. Hierbei wurde der Versuchszeitraum nochmals um einen Tag auf 4 d reduziert und es wurde bereits 6 h nach Einsaat der Zellen mit einer moderaten Konditionierung bei 10 dyn/ cm² begonnen.

### 4.6 Flussversuche mit dem Bioreaktor

#### 4.6.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Besiedlung war auch bei den andern beiden Materialien mit dem für PU etablierten Protokoll erfolgreich. Dennoch zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Scaffolds (Abbildung 4-21).
Abbildung 4-21: REM-Aufnahmen von 3 unterschiedlichen Scaffolds (PU = a,b; Collagen = c,d; BC = e,f). Vollständige Konfluenz konnte bei allen Materialien erreicht werden (links). Bei je einem Versuchsdurchlauf ergab sich jedoch nur eine mangelhafte Besiedlung (rechts), was vermutlich auf die Qualität der Zellen zurückzuführen ist. Bei der schlechten Besiedlung stammten diese alle vom gleichen Spender. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Bei guter Besiedlung ist ein geschlossener Zellrasen zu sehen und das jeweilige Scaffold ist vollständig von Zellen bedeckt (Abbildung 4-21, links). Die pflastersteinartige Morphologie der Endothelzellen ist bei Collagen am stärksten und bei der BC am geringsten ausgeprägt. Auf der anderen Seite gab es aber auch Versuchsdurchläufe, bei denen kein kompakter Zellrasen durch die Besiedlung im BR generiert wurde (Abbildung 4-21, rechts). Bei der BC erscheint die Zellschicht dünn und ist besonders anfällig für Risse im Verlauf des Trocknungsprozesses bei der Probenvorbereitung für das REM. Bei Collagen und PU ist ebenfalls deutlich eine
Besiedlung erfolgt, doch scheinen die EC nicht adäquat auf den FB zu haften. Vereinzelt ist auch die FB-Zellschicht nicht geschlossen und das darunter liegende Scaffoldmaterial kommt zum Vorschein (Abbildung 4-21, b und d). Alle Läufe mit schlechtem Besiedlungserfolg wurden mit Zellen vom gleichen Spender durchgeführt, so dass die mangelhafte Besiedlung eher auf die Zellen, als auf den Besiedlungsprozess zurückzuführen ist. Auch bei der rt-PCR (vgl. 4.6.3) wurden bei diesem Spender starke Abweichungen gemessen, was diese These stützt.

4.6.2 Immunhistochemie


Die native Vene weist positive Markierungen für TE7 auf, insbesondere an der Gefäßwand, aber auch im Inneren der Vene (Abbildung 4-22).

Bei PU ist auffällig, dass die durch TE7 indizierte FB-Schicht sehr ausgeprägt und mehrschichtig ist. Eine Markierung für TE7 ist auch auf Collagen vorhanden, der Zellrasen ist aber nicht vollständig geschlossen. Auf BC ist bei mehreren Präparaten ein geschlossener FB-Monolayer zu erkennen.

Die CD31-Markierung beschränkt sich bei der nativen Vene auf die luminale Zellschicht, wobei Lücken im Zellrasen erkennbar sind.

ICAM ist in der nativen Vene vermehrt auf der luminalen Seite zu finden, ebenso wie an kleinen Venolen in der Gefäßwand. Die auf PU angesiedelten Zellen weisen massive positive Markierungen für ICAM, sowohl in der FB- als auch in der EC-Schicht auf. Die Zellen auf Collagen sind deutlich schwächer markiert und auf BC sind positive Markierungen auf die Außenseite der EC beschränkt.

Die Markierung mit VE-Cad taucht bei der nativen Vene sowie auf BC nur sehr vereinzelt auf und ist in den Zellen auf PU und Collagen gar nicht zu finden.


FN (Fibronectin), Collagen IV und ASMA sind sowohl mit der in Großhadern etablierten Methode mit Paraffinmaterial durchgeführt worden (Kapitel 3.4.1.3), als auch mit Kryo-Material nach der Methode am Institut für Pathologie (Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena) in Jena (Kapitel 3.4.1.5). Dies war für die Materialien Collagen und BC sowie für die native Vene möglich, das PU hingegen spliterte stets beim Versuch es nach dem Einfrieren zu schneiden und konnte somit nur mit der Paraffin-Methode untersucht werden. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind vergleichbar und werden im Folgenden dargestellt.


ASMA kommt in der nativen Vene in der EC-Schicht vor, scheint aber auch schwach in den tiefer liegenden Schichten exprimiert zu sein. Auf PU zeigt sich die Expression (nur im Paraffinmaterial) hingegen nur sehr vereinzelt, die markierte Zelle befindet sich in der EC-Schicht. Auf Collagen und BC sind die FB positiv markiert und darüber hinaus sind in tieferen Schichten der BC vereinzelt positive Markierungen zu finden. Insbesondere beim Kryomaterial ist ASMA auf Collagen deutlich stärker exprimiert als in der nativen Vene während die Expression in Zellen auf BC moderater ist.
Abbildung 4-22: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von nativem Venenmaterial
Ergebnisse

Teil 7

Abbildung 4-23: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten PU-Röhren
Abbildung 4-24: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Collagenröhren
Abbildung 4-25: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Röhren aus bakterieller Cellulose.
4.6.3 RNA-Expressionsuntersuchung

Die Isolation der RNA nach dem Standardprotokoll führte bei den PU- und Collagen-Proben zu einer guten Ausbeute, während bei bakterieller Cellulose die Ausbeute mangelhaft war (Abbildung 4-26). Durch eine RNA-Menge von nur 18 ng/µl war diese zur Untersuchung nicht geeignet.


Für die Auswertung der Proben wurde sich der ΔΔCt-Methode (Kapitel 3.4.3.3) bedient. Hierbei gilt, dass alle Gene, welche einen Wert geringer als 1 aufweisen, im Vergleich zur Zellkultur herunter reguliert sind, während alle Gene mit Werten höher als 1, hochreguliert sind.

IL-6 (PU = 0,53, Koll = 0,21) sowie VCAM (PU = 0,31, Koll = 0,41) sind in beiden Proben um die Hälfte bis um das 4-fache gegenüber der Zellkultur herunter reguliert. Demgegenüber ist IL-8 schwach in auf Collagen kultivierten Zellen (1,14) und stärker in Zellen auf PU (1,79) hochreguliert. Der Marker MCP-1 ist in auf PU kultivierten Zellen schwach hochreguliert (1,33) während er in Zellen auf Collagen schwach herunterreguliert ist (0,84). Die deutlichsten Unterschiede stellten sich bei IL-1α dar. Während die Zellen auf PU nur noch knapp die Hälfte
des Markers exprimierten (0,53), war IL-1α in auf Collagen kultivierten Zellen um das 6-fache gegenüber der Zellkultur erhöht (5,96).


4.7 Zusammenfassung

Wie in Tabelle 4-1 dargestellt variieren die Materialien in Bezug auf Besiedelbarkeit, durchführbare Untersuchungsmethoden, Stabilität und Zellreaktion. Mit PU und BC wurden hierbei die besten Ergebnisse erzielt.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung des Besiedlungserfolges der verschiedenen Materialien.
+ = erfolgreich, (+) = eingeschränkt, - = mangelhaft, n.t. = nicht getestet

<table>
<thead>
<tr>
<th>Besiedlung</th>
<th>PU</th>
<th>Collagen</th>
<th>Dezell. Venen</th>
<th>BC</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>von Patches</td>
<td>n.t.</td>
<td>+</td>
<td>n.t.</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>im BR mit Rotation</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>-</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>im BR mit Perfusion</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>n.t.</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>Untersuchungs- methoden</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>REM</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>IHC (Paraffin)</td>
<td>(+)</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>IHC (kryo)</td>
<td>-</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>RT-PCR</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
<td>n.t.</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Stabilität des Materials</td>
<td>+</td>
<td>-</td>
<td>+</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>Stabilität der Zellschicht</td>
<td>+</td>
<td>(+)</td>
<td>-</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>Zellreaktion auf die Materialien</td>
<td>+</td>
<td>-</td>
<td>n.t.</td>
<td>+</td>
</tr>
</tbody>
</table>
5 Diskussion


Die eingesetzten Scaffoldmaterialien sollten ein möglichst breites Spektrum an Materialeigenschaften und Materialherkunft abdecken um die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Bioreaktors zu belegen. Die verschiedenen Materialien und ihr Besiedlungserfolg wird näher in Kapitel 5.3 diskutiert.

Als problematisch stellte sich im Laufe der Arbeit heraus, dass das Protokoll zur Dezellularisierung der nativen Venen aus patentrechtlichen Gründen nicht näher bekannt war. Dies machte eine detaillierte Fehlersuche nach mangelhaften Besiedlungserfolg nahezu unmöglich.

5.1 Prozessentwicklung zur Verwendung des Bioreaktors

Der BR wies zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Fehler auf, welche nach und nach behoben werden konnten. Zunächst mussten Schlüche und Anschlüsse zur Verbindung der einzelnen BR-Komponenten ausgewählt werden, da die ursprünglich angedachte Verbindung mit Kabelbindern zu Leckagen führte und in der Handhabung umständlich war. Ebenso mussten die Adapter zur Befestigung der Scaffolds auf Scaffoldhalter ausgetauscht werden um eine ausreichend große Besiedlungsfäche zu erreichen. Die Bohrungen im Deckel, welche die Längenverstellbarkeit des Besiedlungszylinders ermöglichten, erwiesen sich als weitere Schwachstelle für die Dichtigkeit des BR. Deshalb wurden die Bohrungen zuverlässig mit Teflonband abgedichtet was allerdings auf Kosten der Längenverstellbarkeit ging. Diese war nur noch mit vermehrtem Aufwand umzusetzen, so dass im Rahmen der

Nach diesen Maßnahmen konnte der BR zuverlässig für die Etablierung des Besiedlungs- und Konditionierungsprogramms verwendet werden.

Zunächst wurden erste Versuche mit PU unternommen und die Röhren mit $7,5 \times 10^5$ Zellen pro cm² besiedelt. Diese Zellzahl geht auf die Besiedlung von Herzklappen in unserem Labor zurück [85] und erwies sich auch bei den Röhren als zielführend. Auch Ott und Ballermann hatten bereits 1995 diese Zellzahl zur Besiedlung von PU-Röhren verwendet [84]. Bei Gulbins et al. kamen ähnliche Zellzahlen (zwischen $5,7 \times 10^5$ und $1 \times 10^6$/ cm²) zum Einsatz [28].

Bei der Besiedlung und Konditionierung der TEVG im BR mit Scherstress stellte sich schnell heraus, dass sich der Zellrasen bei initial minimal einstellbaren 100 dyn/cm² vom Scaffold löste und keine zuverlässige Besiedlung möglich war. Tatsächlich hat auch die Recherche in der Literatur bei der Herstellung von TEVGs deutlich geringere dyn-Werte angezeigt [37], [83], [84]. Darüber hinaus geben Yamamoto und Ando lediglich Scherkräfte von 20 dyn/cm² für arterielle Gefäße und von 1,5 bis 6 dyn/cm² für venöse Gefäße an [86]. Dieser Umstand wurde scheinbar bei der Entwicklung des BR-Prototyps nicht hinreichend betrachtet.

Die für die Besiedlung erforderlichen Perfusionsbedingungen von 10 bis 40 dyn/cm², was je nach Durchmesser der Gefäße zwischen 0,35 und 5 ml/min entspricht, erforderten eine Pumpe mit geringerer Pumpleistung als die verwendete von Welco Co. Ltd. Für eine kostengünstige und schnelle Umsetzung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf einen Infusomat zurückgegriffen, welcher den erforderlichen Scherstress erzeugen konnte und in der Klinik Verwendung findet. Diese Pumpe musste jedoch außerhalb des Brutschrankes betrieben werden, so dass der ursprüngliche Vorteil des BR - der Betrieb komplett in der standardisierten Umgebung eines Brutschanks - wieder aufgehoben wurde. Deshalb sollte für zukünftige Versuche eine entsprechende Pumpe implementiert werden. Von den von Anja Friedrich in unserer Arbeitsgruppe in Erwägung gezogenen Pumpen [77] erfüllen beispielsweise die Pumpen des Typs MCP-E 360 von IDEXX Health & Science GmbH mit 72 µl bis 880 ml/min oder die Pumpen von Williamson Manufacturing Co. Ltd. aus der 200er Serie mit 10 µl bis 412 ml/min die geforderten Bedingungen.
Diskussion

5.2 Potential des „all-in-one“-BR für die kommerzielle Herstellung von TEVG

Während Bioreaktoren beispielsweise von Hoenicka et al., Lyons und Pandit oder Massai et al. über einen komplexen Aufbau zur permanenten Beobachtung verschiedener Parameter wie Druck, pH-Wert, Gas und Temperatur verfügen [87]–[89] oder wie bei Gurjarpadhye et al. die Besiedlung mikroskopisch und nicht-invasiv mitverfolgt werden kann [90], zeichnet sich unser hier präsentierter BR durch seine Handlichkeit und die einfache Implementierung in ein gängiges Zellkulturlabor aus. Es sind lediglich eine Sterilbank für den sterilen Zusammenbau, ein Brutschrank zur Schaffung standardisierter Umgebungsparameter und eine Einrichtung zur Gassterilisation notwendig. Darüber hinaus sind viele der überprüften Parameter durch die Verwendung im Brutschrank bereits vorgegeben, so dass auf eine umfangreiche Sensorik verzichtet werden kann. Mit Herstellungskosten von gerade 400 € ist der BR für Forschungslabore ein attraktives Tool um unter anderem schnelle Materialtestungen oder pharmakologische Tests mit Endpunktbestimmung durchzuführen. Dank seiner Robustheit ist der Einsatz des BR im Rahmen von Langzeitexperimenten denkbar.

Des Weiteren bietet der BR für den Transfer des kardialen TE von der Forschung in die kommerzielle Herstellung einen vielversprechenden Ansatz. Die meisten bisherigen Protokolle zur Entwicklung von TEVG scheitern durch enorme Herstellungskosten und aufwändige Prozedere an einer Umsetzung im Klinikalltag [20], [22], [91]. Mit einem zum Großteil automatisierten Herstellungsprozess von TEVG sinken Kosten, Risiken der Kontamination sowie benutzerabhängige Schwankungen bei der Generierung der TEVG [66], [68], [92].


Unser Ziel sollte die Integration des BR in eine Zellkultivierungs- und Besiedlungsstraße sein, um eine vollautomatisierte Herstellung von TEVG zu realisieren. Durch die verschiedenen Anschlüsse zur Applikation der Zellen, Mediumwechsel und Belüftung ist dies mit dem BR potentiell möglich.
5.3 **Besiedlungserfolg und Eigenschaften der einzelnen Scaffoldmaterialien**

Bis auf die dezellulisierten Venen waren sämtliche Scaffoldmaterialien mit dem BR zu besiedeln. Auch zeigte das Protokoll zur Besiedlung mit anfänglicher Rotation und späterer Perfusion mit bis zu 40 dyn/cm² eine verbesserte Zellmorphologie und Besiedlungseffizienz. Dies scheint den Aussagen von Arrigoni *et al.* entgegen zu laufen, die beobachtet haben, dass die Rotation bei der Besiedlung von Gefäßen mit porcinen SMC bessere Ergebnisse erzielt als die Perfusion [69]. In der vorliegenden Arbeit führte die Besiedlung nur mit Rotation zu verstärkten Multilayer an vereinzelten Stellen und teilweise komplett zellfreien Stellen im Scaffold. Nach zusätzlicher Perfusion und Pulsation war die Zellschicht gleichmäßiger, und die Zellen waren deutlich in Flussrichtung abgeflacht. Die Unterschiede der Besiedlungseffizienz und Zellmorphologie sind möglicherweise auf unterschiedlichen Zellen und Scaffoldmaterialien zurückzuführen. Zudem lag der von Arrigoni verwendete Scherstress lediglich bei 1 dyn/cm², während in der hier vorliegenden Studie Scherkräfte zwischen 10 und 40 dyn/cm² gewirkt haben. Dennoch kann für zukünftige Experimente mit unserem hier vorgestellten BR in Betracht gezogen werden, die Rotation während des gesamten Besiedlungszeitraums fortzuführen und nicht wie bisher nach 6 Stunden gänzlich zu stoppen.

Trotz der prinzipiell guten Besiedelbarkeit von PU, Collagen und BC zeigten sich Unterschiede in der Expression verschiedener Marker wie ASMA, FN, Collagen IV, Interleukinen und TNFα. Auch sind die den Möglichkeiten zur Auswertung der Materialien verschieden. TEVG aus PU waren im kryokonservierten Zustand nicht mit dem Kryotom zu schneiden, was eine IHC unmöglich machte. Zur Einbettung des PU in Paraffin musste das Routineprotokoll zur Paraffineinbettung des Zentrums für Neuropathologie und Prionenforschung am Klinikum der Universität München angepasst werden. RNA konnte nicht in ausreichender Menge von Zellen auf BC gewonnen werden. Darüber hinaus waren das Handling und die Haltbarkeit der Materialien unterschiedlich.

PU erwies sich als zuverlässiger als besiedelndes Material. Dennoch deuten die ausgeprägten Multilayer von FB und EC auf den hier besiedelten PU-Röhren eine mögliche Limitation zur Verwendung als Bypassmaterial an, auch wenn Jeschke *et al.* gezeigt hatten, dass PU gegenüber ePTFE eine geringere Neigung zur Hyperplasie aufweist. Bei einer vergleichenden Untersuchung wurden Röhren aus PU beziehungsweise aus PTFE in die Bauchaorta von Ratten implantiert und nach festgelegten Zeiträumen wieder explantiert und untersucht. Dabei wiesen die PU-Grafts eine schnellere luminale Endothelialisierung, geringere chronische intimale Proliferation und eine deutlich dünnere Neointima im Gegensatz zu den PTFE-Röhren auf [96].

Auf Collagen war hingegen die Besiedlung weder vollständig, noch war das Material aufgrund mangelhafter Nahtfestigkeit stabil genug um potentiell einem Patienten eingesetzt zu werden. Auch hier war mehrfach die Bildung von Multilayer zu beobachten. Das Problem der geringen
Stabilität wurde bereits von Weinberg und Bell aufgezeigt und durch Kombination des Collagens mit Dacron umgangen [17].


Bei BC zeigte sich, dass die Zellen auf dem Material bevorzugt als Monolayer wuchsen. Hier waren der Innendurchmesser der BC-Röhren und der Durchmesser des Adapters annähernd gleich.


Aktivierte FB zeichnen sich durch eine hohe kollagenolytische Aktivität aus, was die Instabilität des besiedelten Collagens erklären kann. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung der Zellen auf PU und insbesondere auf BC deutlich geringer.

Ebenso wie ASMA in FB deutet FN in EC auf einen aktivierte Phänotyp hin [101] und ist wiederum in Zellen auf Collagen besonders stark exprimiert. Ob dieses morphologische Bild funktionell eine reine Destruktion widerspiegelt oder ob es sich hierbei im Idealfall um ein spezifisches organtypisches Matrixremodelling handelt sollte Thema weiterführender Untersuchungen sein.

Grundsätzlich scheinen die Zellen auf Collagen die stärkste Aktivierung zu erfahren, während diese auf PU moderater ist, im Vergleich zur nativen Vene aber immer noch erhöht. Laut Yang et al. führt die Kultivierung von Zellen auf BC des Herstellers Xellute zu einem ruhenden Phänotyp [102], was eine Erklärung für die geringe Aktivierung und die Ausbildung von Mono- statt Multilayern liefern könnte.

Interessant ist schließlich, dass Collagen IV, ein Protein, das laut Pöschl et al. für die Aufrechterhaltung der Funktion der Basalmembran unter steigenden mechanischen Ansprüchen essentiell ist [103] an der Grenzfläche zwischen BC und FB sehr stark exprimiert ist, während es auf Collagen schwächer und auf PU nicht vorhanden ist.

Zusammenfassend zeigen die immunhistochemischen Untersuchungen der besiedelten und konditionierten Scaffolds, dass eine Zellantwort abhängig vom Trägermaterial ist. Collagen fördert am deutlichsten die Aktivierung der Zellen mit dem Ergebnis einer Lyse des Scaffolds.
PU und BC scheinen inerter zu sein, was sich positiv auf die Formierung einer geschlossenen luminalen Zellschicht auswirkt. Eine Destruktion des Trägermaterials ist nicht nachweisbar. Eine Besiedlung des Trägermaterials im Sinne eines physiologischen Wandaufbaues ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht zu verzeichnen, so dass die Stabilität des Grafts primär von den physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials bestimmt wird. Da Mattace-Raso et al. und Cohn den Grad der Starrheit arterieller Gefäße mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assozieren [104], [105], ist es möglich, dass die weichere und flexiblere BC dem recht starrem PU überlegen ist.

Postlethwaite et al. zeigten bereits 1988, dass eine Inkubation von FB mit 27,5 pg/ml IL-1α für 24 h unter anderem zu einer 8-fach erhöhten Synthese von Collagenasen und zum Wachstum und zur Proliferation von FB führt [106]. Die Destruktion des Collagen-Scaffolds im Rahmen der Besiedlung in dieser Arbeit ist somit mit der erhöhten IL-1α-Expression zu erklären, welche bei der RNA-Untersuchung gezeigt wurde. Die starke Aktivierung der Zellen, wie sie auf Collagen erfolgte, blieb hingegen auf PU aus.

Gegenüber der verzeichneten Unterschiede in der IL-1α-Expression sank die Expression des proinflammatorischen Markers IL-6 sowohl bei konditionierten Zellen auf PU als auch in noch stärkerem Maße auf Collagen. Dies entspricht früheren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe, bei denen Thierfelder nachgewiesen hatte, dass IL-6 bei der Kokultivierung und Konditionierung von FB und EC auf PU-Herzklappen gegenüber unkonditionierten FB deutlich reduziert war [48].

IL-8, was in EC an der Angiogenese beteiligt ist [107] wird durch Scherstress in seiner Expression angeregt [108], [109]. Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen dieser Untersuchung insbesondere für Zellen auf PU gemacht werden, während der Effekt in Zellen auf Collagen nur sehr schwach ausgeprägt war.

Chiu et al. zeigten, dass die TNFα-abhängige (engl.: Tumor Necrosis Factor alpha) Reduktion von VCAM durch Scherstress induziert wird [110]. DeVerse et al. fanden heraus, dass die Veränderung der Expression von der Intensität des Scherstresses abhängt. So beschreiben die Autoren eine Erhöhung von VCAM um 150 % bei Scherstress von nur 2 dyn/cm² während bei 12 dyn/cm² eine Reduktion um 70 % im Vergleich zur statischen Kultur erfolgte [111]. Die untersuchten Zellen in der hier vorliegenden Arbeit wurden einem Scherstress von bis zu 40 dyn/cm² ausgesetzt und zeigten eine ähnliche Reduktion der VCAM-Expression von auf Collagen als auch auf PU kultivierten Zellen.

Eine Untersuchung der auf BC aufgebrachten und konditionierten Zellen mittels PCR fand nicht statt. Laut Hersteller bildet sich bei der Kultivierung der Zellen auf BC eine so starke ECM, dass konventionelle Lysepuffer keinen ausreichenden Aufschluss der Zellen erzielen können. Eine Klärung dieses Sachverhalts sollte Teil fortführender Untersuchung zur BC als Trägermaterial für TE sein.

6 Ausblick


I. Abkürzungsverzeichnis

<table>
<thead>
<tr>
<th>Abkürzung</th>
<th>Deutscher Begriff</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>°C</td>
<td>Grad Celsius</td>
</tr>
<tr>
<td>Aqua dest.</td>
<td>destilliertes Wasser (lat.: aqua destillata)</td>
</tr>
<tr>
<td>ASMA</td>
<td>engl.: Alpha Smooth Muscle Actin</td>
</tr>
<tr>
<td>BC</td>
<td>bakterielle Cellulose</td>
</tr>
<tr>
<td>bpm</td>
<td>engl.: beats per minute</td>
</tr>
<tr>
<td>BR</td>
<td>Bioreaktor</td>
</tr>
<tr>
<td>CAV</td>
<td>engl.: Cardiac Allograft Vasculopathy</td>
</tr>
<tr>
<td>CCC</td>
<td>engl.: Collagen Cell Carrier</td>
</tr>
<tr>
<td>d</td>
<td>Tag(-e)</td>
</tr>
<tr>
<td>DMSO</td>
<td>Dimethylsulfoxid</td>
</tr>
<tr>
<td>EC</td>
<td>Endothelzellen (engl.: endothelial cells)</td>
</tr>
<tr>
<td>ECGM</td>
<td>engl.: endothelial cell growth media</td>
</tr>
<tr>
<td>ECM</td>
<td>extrazelluläre Matrix (engl.: extracellular matrix)</td>
</tr>
<tr>
<td>EPC</td>
<td>endotheliale Vorläuferzellen (engl.: endothelial progenitor cells)</td>
</tr>
<tr>
<td>ePTFE</td>
<td>expandiertes Polytetrafluorethylen</td>
</tr>
<tr>
<td>EtOH</td>
<td>Ethanol</td>
</tr>
<tr>
<td>FB</td>
<td>Fibroblasten</td>
</tr>
<tr>
<td>FCS</td>
<td>fötales Kälberserum (engl.: foetal calf serum)</td>
</tr>
<tr>
<td>FGM</td>
<td>engl.: fibroblast growth media</td>
</tr>
<tr>
<td>FN</td>
<td>Fibronektin</td>
</tr>
<tr>
<td>GMP</td>
<td>gute Herstellungspraxis (engl.: Good Manufacturing Practice)</td>
</tr>
<tr>
<td>h</td>
<td>Stunden</td>
</tr>
<tr>
<td>HE</td>
<td>Hämalaun-Eosin</td>
</tr>
<tr>
<td>HSA</td>
<td>humanes Serumalbumin</td>
</tr>
<tr>
<td>HUVEC</td>
<td>engl.: human umbilical vascular endothelial cell</td>
</tr>
<tr>
<td>IC</td>
<td>Immunzytochemie (engl.: Immunocytochemistry)</td>
</tr>
<tr>
<td>ICAM</td>
<td>engl.: Intercellular Adhesion Molecule</td>
</tr>
<tr>
<td>IHC</td>
<td>Immunhistochemie</td>
</tr>
<tr>
<td>IL</td>
<td>Interleukin</td>
</tr>
<tr>
<td>iPS-Zellen</td>
<td>induzierte pluripotente Stammzellen (engl.: induced pluripotent stem cells)</td>
</tr>
<tr>
<td>l</td>
<td>Liter</td>
</tr>
<tr>
<td>LDL</td>
<td>engl.: Low-Density-Lipoprotein</td>
</tr>
<tr>
<td>MCP-1</td>
<td>engl.: Monocyte Chemotactic Protein-1</td>
</tr>
<tr>
<td>mg</td>
<td>Milligramm</td>
</tr>
<tr>
<td>min</td>
<td>Minuten</td>
</tr>
<tr>
<td>Abkürzung</td>
<td>Definition/Englischer Begriff</td>
</tr>
<tr>
<td>-----------</td>
<td>------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>ml</td>
<td>Milliliter</td>
</tr>
<tr>
<td>mm</td>
<td>Millimeter</td>
</tr>
<tr>
<td>p</td>
<td>Passage</td>
</tr>
<tr>
<td>PCR</td>
<td>Polymerasekettenreaktion (engl.: <em>polymerase chain reaction</em>)</td>
</tr>
<tr>
<td>PBS</td>
<td>Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <em>phosphat buffered saline</em>)</td>
</tr>
<tr>
<td>PMMA</td>
<td>Polymethylmethacrylat</td>
</tr>
<tr>
<td>PU</td>
<td>Polyurethan</td>
</tr>
<tr>
<td>REM</td>
<td>Rasterelektronenmikroskopie</td>
</tr>
<tr>
<td>RNA</td>
<td>Ribonukleinsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>U/ min</td>
<td>Umdrehungen pro Minute</td>
</tr>
<tr>
<td>RT</td>
<td>Raumtemperatur</td>
</tr>
<tr>
<td>s</td>
<td>Sekunden</td>
</tr>
<tr>
<td>SMC-Myosin</td>
<td>engl.: <em>smooth muscle cell myosin</em></td>
</tr>
<tr>
<td>TE</td>
<td>engl.: <em>tissue engineering</em></td>
</tr>
<tr>
<td>TEHV</td>
<td>engl.: <em>tissue engineered heart valves</em></td>
</tr>
<tr>
<td>TEVG</td>
<td>engl.: <em>tissue engineered vascular graft</em></td>
</tr>
<tr>
<td>TNFα</td>
<td>engl.: <em>tumor necrosis factor alpha</em></td>
</tr>
<tr>
<td>U</td>
<td>Unit</td>
</tr>
<tr>
<td>ü.N.</td>
<td>über Nacht</td>
</tr>
<tr>
<td>VCAM</td>
<td>engl.: <em>Vascular Cellular Adhesion Molecule</em></td>
</tr>
<tr>
<td>VE-Cad</td>
<td>engl.: <em>Vascular Endothelial Cadherin</em></td>
</tr>
<tr>
<td>VSM</td>
<td>große Beinvene (lat.: <em>Vena saphena magna</em>)</td>
</tr>
</tbody>
</table>
II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Darstellung des Aufbaus von Gefäßen (modifiziert nach [4]) ...................... 8
Abbildung 2-2: Darstellung einer fortschreitenden Arteriosklerose in 4 Schritten nach [7].....10
Abbildung 3-1: Polyurethan-Röhre mit 25 Schichten PU..............................................................18
Abbildung 3-3: Collagen-Röhre mit 3,5 mm ø, auf die verwendete Länge von 6 cm zugeschnitten.........................................................................................................................19
Abbildung 3-4: Röhre aus BC ...........................................................................................................20
Abbildung 3-5: Ein Stück Beinvene zur Gewinnung von primären Endothelzellen und Fibroblasten .........................................................................................................................20
Abbildung 3-6: Darstellung der Deckglasmethode zur Isolation von FB (grau). Die Venenstücke (gelb) werden in einer Zellkulturschale unter einem Deckglas, fixiert durch Silikontropfen (blau), positioniert. Die FB erreichen innerhalb von ca. 2 Wochen Konfluenz .....................22
Abbildung 3-7: Zählquadrate der Neubauer-Kammer; ein auszuzählendes Großquadrat ist rot umrandet ..............................................................................................................................................24
Abbildung 3-8: Bioreaktor zur Besiedlung und Konditionierung von Gefäßprothesen. Entnommen aus [77] .................................................................................................................................25
Abbildung 3-9: Übersicht von sterilisierten Komponenten des BR; a: Besiedlungszylinder und Reservoir, b: Schläuche sowie diverse Adapter.........................................................................................26
Abbildung 3-10: Besiedlung von BC in 2D. Die ersten 3 Wells sind mit Material von Röhren bestückt, die letzten 3 mit deutlich dünneren Patches. Zur Fixierung der Patches in einer 24-Well-Platte wurden Teflonröhrrchen verwendet ..............................................................................27
Abbildung 3-11: Ansicht des Scaffoldhalters (1), an welchem mit chirurgischem Faden (2) zwei Venen (3) eingespannt sind. In der Abbildung sind noch die zunächst getesteten Luer-Lock-Adapter aus Metall (VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Deutschland) zu sehen. Diese wiesen nach mehrmaliger Verwendung Ablagerungen auf, so dass auf Nylonadapter umgestiegen wurde. .......................................................... 27

Abbildung 3-12: Darstellung des funktionsbereiten BR mit Mixer (1), Einspritzstelle für die Zellen (3), Reservoir (4) sowie der Steuerungseinheit (5) zur Rotation der Scaffolds. .......................................................... 28

Abbildung 3-13: Finales Flussprofil zur Konditionierung von TEVG. Nach der Besiedlung (rote Sterne) mit FB (t = 0 h) wurde der Scherstress stufenweise zunächst auf 10 dyn/cm² (t = 6 h) und dann auf 20 dyn/cm² (t = 24 h) erhöht. EC wurden bei t = 48 h ausgesät und ebenso wie die FB perfundiert. Die Pulsation startet (grüne Sterne) bei t = 24 h, wird zur Aussaat der EC gestoppt und startet erneut bei t = 72 h. Nach 96 h wird der Scherstress schließlich auf 40 dyn/cm² erhöht und 1 h später die TEVG geerntet (gelber Stern) .......................................................... 30

Abbildung 3-14: Arbeitsplatz zur Anfertigung von Paraffinschnitten (a) mit Kryotom (1), Paraffinblöckchen (2), Kühlseinheit (3) und beheizbarem Wasserbad (4), sowie eine absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Präparate (b) .......................................................... 33

Abbildung 4-1: REM-Aufnahmen der 4 verwendeten Scaffoldmaterialien (a bis h) vor Besiedlung von innen (links) und außen (rechts), sowie von einer nativen Vene (i, j). Durch die Aufnahmen werden deutliche Strukturunterschiede zwischen PU (a, b), Collagen (c, d), dezellularisierten Venen (e, f) und Röhren aus BC (g, h) sichtbar. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild) .......................................................... 41

Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbung einer dezellularisierten Vene gegen CD31 (a) und TE7 (b). Vereinzelt sind positive Markierungen für CD31 im tiefer gelegenen Gewebe zu finden (s. Kreis), während TE7 sowohl vereinzelt auf der luminalen Seite (s. Pfeile) als auch in den tiefer gelegenen Schichten der Vene (s. unterhalb der Sterne) detektierbar ist .................. 42

Abbildung 4-3: Immunzytochemische Färbung von FB (a-f) und EC (g-i). FB sind positiv für die Marker TE7 (a), Fibronektin (e) und ASMA (f). Eine Schwache Positivität liegt für Collagen IV (c) und SMC-Myosin (d) vor. Die EC hingegen sind negativ für TE7 (g) und positiv für CD31 (h). Eine schwach positive Markierung liegt für VE-Cadherin in EC (i) vor. Maßstabsbalken: a, b, g und h: 100 µm, c bis f und i: 50 µm .......................................................... 43

Abbildung 4-4: Durch Undichtigkeiten am BR konnte Feuchtigkeit zwischen die Bodenplatte und die angeschraubten Komponenten gelangen, was zur Korrosion führte. .......................... 44
Abbildung 4-5: Querschnitt (a) und Aufsicht (b) des Besiedlungszylinders, bestehend aus einem zylinderförmigen Gehäuse (1) mit Schraubdeckel (2). Der Scaffoldhalter verfügt über einen Auslass (3) und einen Einlass (4) die mit 4 Stäben (5) adjustiert werden können. Die zwei simultan perfundierbaren TEVG (6) werden mit Gefäßkanülen (7) fixiert während die Stäbe mit Muttern aus Teflon (8) befestigt werden. Luer-Lock-Adapter (9) ermöglichen eine einfache Handhabung zur Befüllung des Zylinders und zur Verbindung mit dem Schlauchsystem (aus [82]).


Abbildung 4-7: Isometrische Darstellung des Aufbaus des Bioreaktors mit Hinweis auf die notwendigen Umbaumaßnahmen für einen fehlerfreien Betrieb des BR.

Abbildung 4-8: Messung der Druckverhältnisse im BR am Luer-Lock-Anschluss zum Scaffold bei einer Perfusion mit 12 ml/ min. Durch die Verwendung des Pulsers ergeben sich starke Druckunterschiede (rot), während ohne Einsatz des Pulsers nur sehr geringe Druckschwankungen auftreten (blau). Die Druckkurve mit Pulser erinnert an Systole und Diastole unter physiologischen Bedingungen.

Abbildung 4-9: Verbindung des BR mit einem Infusomat an Stelle der ursprünglich verwendeten Pumpe von Welco. Der Aufbau des BR in der Sterilwerkbank (a) erfolgte wie mit der anderen Pumpe. Um die Schläuche nicht in der Dichtung des Brutschranks abzuklemmen, wurden an der Tür Abstandshalter (siehe Kreise, b) installiert.

Abbildung 4-10: Finale Verbindung der einzelnen Komponenten des BR mit Schläuchen unter Verwendung der ursprünglichen Pumpe. Neben den hier sichtbaren 3-Wege-Hähnen (Pfeile) wurden die roten Verschlusskappen am Besiedlungszylinder auch durch 3-Wege-Hähne ersetzt (Sterne), was das Befüllen und Entlüften deutlich vereinfachte.

Abbildung 4-11: REM-Aufnahmen (a) und immunhistochemische Färbungen (b, c) der besiedelten PU-Röhren. PU war im Bioreaktor ohne Fluss gut zu besiedeln, es zeigte sich aber, dass die Zellschicht wenig adhärent war und die EC keinen pflastersteinförmigen Monolayer ausbildeten. Auch lösten sich die Zellen teilweise vom Scaffold. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Abbildung 4-12: REM-Aufnahmen von PU-Proben mit verschiedenen Schichtdicken. Unabhängig von der Schichtdicke wies PU eine vergleichbare Morphologie im unbesiedelten
Zustand (links) auf. Auch ließ sich das PU bei jeder Schichtdicke sowohl mit FB (Mitte), als auch mit FB und EC (rechts) besiedeln. Vergrößerung: 1000-fach ..................................................52


Abbildung 4-14: REM-Aufnahmen (a, d und g) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f, h, i) von besiedelten Collagen-Röhren in 3 verschiedenen Versuchsdurchläufen (1 = a-c, 2 = d-f, 3 = g-i). Die Besiedlung erwies sich in allen Versuchen als unvollständig. Darüber hinaus zeichnete sich das Material durch eine geringe Reißfestigkeit aus und konnte schnell beschädigt werden. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild). ..........................................................53

Abbildung 4-15: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von im BR rebesiedelten dezellularisierten Venen. Es ist ein Beispiel für einen verhältnismäßig guten Besiedlungserfolg der dezellularisierten Vene (a-c), sowie für eine schlecht bis gar nicht besiedelte Vene (e-f) dargestellt. Der Zellverband löste sich allerdings auch bei der gut besiedelten Vene im Laufe der Präparation wieder ab (vgl. b, c). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild). .............................................54

Abbildung 4-16: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von besiedelter BC. Die Besiedlung war sowohl in Form eines Patches (a - c), als auch in Form der Röhre (d bis f) möglich. Es bildeten sich geschlossene Monolayer, welche bei den aufgeschnittenen Röhren aber durch die Probenvorbereitung fürs REM Risse bekamen (siehe d). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild). ..............55

Abbildung 4-17: REM-Aufnahmen der unter Fluss besiedelten PU-Röhren. Während bei hohem Fluss mit 18 ml/ min (a) keine Zellen am Material adhärieren konnten, blieben beim minimal einstellbaren Fluss von 12,5 ml/ min (b) vereinzelt Zellen am Scaffold haften und wiesen eine starke Ausrichtung in Flussrichtung (s. Pfeil) auf. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild). .........................................................................56


Abbildung 4-19: REM-Aufnahmen besiedelter PU-Röhren nach einem Protokoll, bei dem der maximale Scherstress 40 dyn/ cm² betrug und die Zellen insgesamt für 5 Tage kultiviert
wurden. Es fand sich ein glatter und homogener Zellrasen (a, b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).


Abbildung 4-21: REM-Aufnahmen von 3 unterschiedlichen Scaffolds (PU = a,b; Collagen = c,d; BC = e,f). Vollständige Konfluenz konnte bei allen Materialien erreicht werden (links). Bei je einem Versuchsdurchlauf ergab sich jedoch nur eine mangelhafte Besiedlung (rechts), was vermutlich auf die Qualität der Zellen zurückzuführen ist. Bei der schlechten Besiedlung stammten diese alle vom gleichen Spender. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Abbildung 4-22: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von nativem Venenmaterial

Abbildung 4-23: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten PU-Röhren

Abbildung 4-24: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Collagenröhren

Abbildung 4-25: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Röhren aus bakterieller Cellulose

Abbildung 4-26: Mittelwerte der gemessenen RNA-Konzentration in ng/µl für die Isolation der RNA aus nativem Venenmaterial (VSM), Zellen isoliert nach Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor auf den 3 verschiedenen Scaffolds sowie Zellen aus der Zellkultur (Kokultur von FB und EC). Auf bakterieller Cellulose und im nativen Material war der RNA-Gehalt so gering, dass eine Untersuchung der Proben mittels rt-PCR nicht möglich war.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Ansprüche an optimale Gefäßprothesen sowie Vor- und Nachteile von Homografts und ePTFE-Prothesen [12]–[16]. Die Bedingungen sind zum Teil nicht erfüllt (-), bedingt erfüllt (+) oder vollständig erfüllt (++) .......................................................... 12

Tabelle 3-1: Übersicht der Verdünnung und Hersteller der verwendeten Antikörper für IC, IHC für die Paraffinschnitte inklusive der dazugehörigen Demaskierungsverfahren und für die IHC an Kryoschnitten ........................................................................................................ 35

Tabelle 4-1: Zusammenfassung des Besiedlungserfolges der verschiedenen Materialien.... 68
IV. Literaturverzeichnis


7 Eidesstattliche Versicherung

Schulte, Julia
Name, Vorname

Arbeiten von Kollegen oder Unterstützung der Arbeit durch Kollegen wurde in der vorliegenden Dissertation im Text und in der Danksagung deutlich gemacht.
Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.
Meine Tätigkeit in dem Unternehmen Xellutec GmbH, Hersteller der bakteriellen Cellulose, hatte keinen Einfluss auf die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

92
8 Lebenslauf

Name: Julia Schulte

Geburtsdatum/ -ort: 14.04.1984 / Paderborn

Staatsangehörigkeit: Deutsch

05/2014 - 03/2016 Projektmanagerin der Xellutec GmbH, Neuried

09/2011 - 06/2016 Bearbeitung der vorliegenden Promotion in der Arbeitsgruppe „kardiales Tissue Engineering“ von Dr. Akra und unter Leitung von Prof. Dr. Überfuhr am Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München

03/2009 - 08/2011 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Extrazelluläre Matrix“ bei Prof. Bernd am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Thema: „Untersuchung zur Verteilung von EMT-Markern im Urothelzellkarzinom der Harnblase (UBC) – Einfluss tumorassoziierter Fibroblasten“


10/2004 - 08/2011 Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena; Diplom im Studienfach Biochemie

08/1994 - 06/2004 Abitur am Pelizaeus-Gymnasium, Paderborn

08/1990 - 06/1994 Grundschule, Altenbeken
9 Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München zu absolvieren bedanke ich mich bei dem Leiter Prof. Dr. Christian Hagl.

Bei Prof. Dr. Peter Überfuhr bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion, kritische Rückfragen, Geduld und stets motivierende Worte, insbesondere auf den „letzten Metern“.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Koeppel und Prof. Dr. Stefan Kääb für die Bereitschaft, an meiner Promotionsvorprüfung als Nebenprüfer aufzutreten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Bassil Akra, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit gegeben hat, im Bereich des kardialen Tissue Engineering zu promovieren, was auch für mich persönlich ein überraschend spannendes Thema ist. Darüber hinaus hat er mein Verständnis von anwendungsorientierter Forschung ganz entscheidend mit geprägt und mir während meiner Arbeit viel Freiraum für eigene Ideen gelassen. Hervorzuheben ist sein ausgeprägtes Engagement bei der Unterstützung meiner Arbeit. Bei Problemen oder Nachfragen konnte ich ihn jederzeit, auch während seiner Freizeit, um Rat bitten.

Für die Entwicklung des Bioreaktors und die Einweisung in die Programmierung des Gerätes bedanke ich mich ganz herzlich bei Anja Friedrich ohne deren Vorarbeit diese Arbeit nicht hätte entstehen können.


Bei meinen Kollegen möchte ich mich für viel Unterstützung, gute Gespräche und einfach eine tolle Zeit bedanken. Dr. Trixi Hollweck danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, das Interesse an meiner Arbeit, konstruktive Kritik bei allen Veröffentlichungen und ihre tolle Art, durch die ich mich in der AG von Anfang an heimisch gefühlt habe. Ulrike Haas und Barbara Steinl gilt mein Dank für Ihre Hilfe im täglichen Laboralltag. Sie unterstützten mich mit vielen Tipps und bei Bedarf auch mit

Bei meinem ehemaligen Jenaer Diplomarbeitsbetreuer Prof. Dr. Alexander Berndt bedanke ich mich für wissenschaftlichen Austausch, für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung der kryokonservierten Präparate und ein immer offenes Ohr ebenso wie seine immer offenen Worte.

Für die freundliche Unterstützung bei der Probeneinbettung in Paraffin sowie die Erlaubnis zur Verwendung von Geräten und Materialien seien an dieser Stelle Frau Henn und Frau Knörndel aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung am Klinikum der Universität München dankend erwähnt.


10 Vorveröffentlichung:


Processes 2013, 1, 1-x manuscripts; doi:10.3390/pro10x000x

A novel seeding and conditioning bioreactor for vascular tissue engineering

Julia Schulte 1, Anja Friedrich 2, Trixi Hollweck 1, Fabian König 1, Markus Eblenkamp 2, Andres Beiras-Fernandez 3, Cornelia Fano 4, Christian Hagl 1 and Bassil Akra 1*

1 Department of Cardiac Surgery, Laboratory for Tissue Engineering, Medical Center Munich University, Munich, Germany; E-Mail: Julia.Schulte@med.uni-muenchen.de; Trixi.Hollweck@med.uni.muenchen.de; Fabian.Koenig@med.uni-muenchen.de; Christian.Hagl@med.uni-muenchen.de

2 Institute of Medical and Polymer Engineering, Technische Universität München, Garching, Germany; E-Mail: anja.friedrich@mytum.de; markus.eblenkamp@tum.de

3 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt, Germany; E-Mail: Andres.Beiras@kgu.de

4 Institute of Textile Technology and Process Engineering, Denkendorf, Germany; E-Mail: cornelia.fano@itv-denkendorf.de

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Bassil.Akra@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49 (0)89 7095-6465; Fax: +49 (0)89 7095-8873.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Multiple efforts have been made to develop small-diameter tissue engineered vascular grafts using a great variety of bioreactor systems at different steps of processing. Nevertheless, there is still an extensive need for a compact all-in-one system providing multiple and simultaneous processing. The aim of this project was to develop a new device to fulfil the major requirements of an ideal system that allows simultaneous seeding, conditioning and perfusion. The newly developed system can be actuated in a common incubator and consists of six components: a rotating cylinder, a pump, a pulse generator, a control unit, a mixer and a reservoir. Components that are in direct contact with cell media, cells and/or tissue allow sterile processing. Proof-of-concept experiments were performed with polyurethane tubes, collagen tubes and decellularised human veins. The scaffolds were seeded with fibroblasts and endothelial cells that were isolated from human saphenous vein segments. Scanning electron microscopy and immunohistochemistry showed better seeding success of polyurethane...
scaffolds in comparison to the other two groups. Conditioning of the best-colonised scaffold material with 100 dyn/cm² resulted in cell detachments, whereas a moderate conditioning program with stepwise increase of shear stress from 10 to 40 dyn/cm² induced a stable and confluent cell layer. The new bioreactor presents a powerful tool for the development and evaluation of tissue engineered vascular grafts for human application and/or for medical product testing.

**Keywords:** Tissue engineering, bioreactor, vascular graft, polyurethane, collagen, decellularised tissue

1. **Introduction**

Chronic ischemic heart disease, coronary artery disease and cardiac infarction are the most common causes of death worldwide, accounting for 25.6% of all fatal casualties [1]. Mainly they are caused by a restriction of the coronary circulation commonly affected by atherosclerotic occlusion [2].

The use of patient’s native veins to replace faulty blood vessels is still the silver bullet in clinical practice [3,4]. Although minimal invasive techniques seem to outstrip the conventional vascular replacement [5], surgical bypass is still performed in numerous patients [6]. Coronary artery bypass grafting (CABG) using intact autologous veins results in less events of stroke, myocardial infarction (MI) or repeated revascularisation in long-term application compared to percutaneous coronary intervention (PCI) [7,8]. The results of the SYNTAX study from 2011 [9,10] permit the identification of patients that have a greater benefit from bypass surgery instead of PCI.

Upon some patients that cannot be treated with PCI and/or those that do not possess adequate autologous vessel material for CABG, there is still an increasing need for new innovative implants [11]. Native vessels and conventional PTFE grafts show various limitations like reocclusion, aneurysm formation and/or thrombogenicity. Processing techniques for artificial grafting aim to overcome these limitations by enabling the development of smaller graft diameters (inner diameter < 6 mm) [4,12,13]. Currently, there are multiple approaches under investigation to develop an ideal graft. Apart from a small number of scaffold-free concepts, organic or synthetic, degradable or non-degradable scaffolds are in common use [4].

An untreated surface often leads to rejection, requiring coatings like heparin to avoid occlusion by clotting [14] or paclitaxel to suppress hyperplasia [15]. The different coatings have a great positive value on the performance of the scaffold material, however, the integrity of these coatings is compromised in most of the cases at high flow rates [16]. Another promising strategy is seeding of the graft with endothelial cells (ECs) [17,18]. This unstable cell-matrix-interaction can be supported and guaranteed by pre-seeding the new prosthesis with vascular fibroblasts (FBs) mimicking the cellular structure of healthy subjects [19,20]. Various cell sources like stem cells [21], endothelial progenitor cells [22] or isolated vascular ECs [23] are under investigation for graft seeding. Depending on their origin, stem cells come up to a high growth and repair potential as reported in many cases [24-26].
Embryonic stem cells for therapeutic purpose reveal ethical and legal concerns, and are therefore not currently used for tissue engineering investigation. Tumour formation is an actual risk of embryonic stem cells due to their indefinite propagation as well as immunologic intolerance caused by the allogeneic nature [24,26-28]. Without any ethical concerns adult stem cells can be derived from the patient and are therefore autologous in nature. Additional possible sources are bone marrow, peripheral blood, skeletal muscle and on long term, placental cord blood. However, the induced transdifferentiation of adult stem cells at the necessary efficiency is infeasible. If these disadvantages remain unsolved embryonic and adult stem cells cannot be regarded as standard options for tissue engineering [26,27,29].

In contrast, autologous differentiated ECs derived from the saphenous vein segments do not require any immune suppression and have no carcinogenic potential. The invasive surgical procedure associated with the sacrifice of intact vascular donor tissue is the exigency for a safe cell source [30]. In addition to material surface modification, it is known that shear stress and transmural pressure influence the shape and biosynthesis of vascular cells. The effects are structural remodelling and flattening of ECs as well as activation of signalling cascades [31,32]. In case of inappropriate or absent signals, cells only poorly proliferate, lose cell-cell contacts and their ability to form organised tissues [33,34]. The cells dedifferentiate and no extracellular matrix (ECM) is established. In summary, mechanical stress is essential for the achievement of a good quality ECM [35].

Due to the above listed essential conditions for the development of a cell-based graft, different bioreactors were developed in the last years to simulate physiological conditions, such as temperature, blood flow, shear stress or mechanical strain. These systems play a crucial role in building tissue engineered constructs [36]. They can be used for seeding and conditioning as well as for mechanical stress tests under physiological conditions [37]. As a general rule, the development of tissue engineered implants should be realized in a sterile system under stable physiological conditions (shear stress and blood flow) [17,31,38,39] allowing reproducible and low cost processes. They should enable the observation of different parameters like CO₂, nutrients and growth factors to guarantee a good manufacturing practice [40].

So far, only few research groups have developed bioreactors with the capability to perform dynamic seeding and pulsatile flow processes of multiple grafts under physiological conditions simultaneously [41-48]. Therefore, the aim of this study was to develop an all-in-one BR offering comparative test results, adjustable process parameters and simple handling.

2. Experimental Section

2.1. Bioreactor development
2.1.1. Construction

All parts were designed using the computer-aided software Catia V5R19 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France). Non-electric BR components were manufactured in-house. Parts that are in contact with cell media, cells and/or tissue were developed in a way that allows reprocessing. The BR system consists of six components: a seeding cylinder, a rotating mixer, a media reservoir, a control unit, a roller pump and a pulse generator. All parts are assembled on a square ground plate made of polyvinylchloride (PVC) with a length \( l = 400 \text{ mm} \) and height \( h = 15 \text{ mm} \). The dimensions allow the actuation of the bioreactor in a standard incubator.

**Seeding device**

The seeding device (Figure 1) comprises a cylinder filled with cell culture medium surrounding the TEVG. In the cylinder, two pairs of fixed vessel cannulas allow a simultaneous perfusion of two TEVGs. The housing of the cylinder with an outer diameter \( D = 65 \text{ mm} \), an inner diameter \( d = 46 \text{ mm} \), an outer height \( H = 155 \text{ mm} \) and an inner height \( h = 130 \text{ mm} \) is made from polymethyl methacrylate (PMMA) and narrows to \( d = 15 \text{ mm} \) before one cylinders ending. In this part the cylinder offers a guide rail (depth = 15 mm, \( l = 10 \text{ mm} \)) to secure the cylinder position on the mixer. On the opposite ending, a metric thread (M64x1.5) is milled to lock the cylinder with a screw cap (\( D = 73 \text{ mm} \), \( d = 48 \text{ mm} \), \( h = 15 \text{ mm} \)) and a step (depth = 14 mm) with \( d = 55 \text{ mm} \) is created to countersink the integrated scaffold carrier of the seeding device.
Figure 1. Transversal section (a) and top view (b) of the seeding device (a) composed of a cylindric housing (1) with screw cap (2). The scaffold carrier with an outlet (3) and an inlet (4) is adjusted with four spacers (5) and allows a simultaneous perfusion of two TEVGs (6). The scaffolds are fixed with vessel cannulas (7) while the spacers are fixed with screw nuts (8). Luer-Lock-adapters (9) simplify filling processes and connection to the tubing system.

The scaffold carrier of the seeding device is composed of an outlet (Figure 1, (3), d = 46 mm, h = 28.5 mm with a nose of d = 15 mm, h= 45 mm) and an inlet (Figure 1, (4), d = 55 mm, h = 15 mm with a nose of d = 15 mm, h= 15 mm and outlet) made of polyoxymethylene (POM). Both elements are composed of two parts to generate branched supply channels, exemplified in detail for the outlet in Figure 2 and Figure 3.
Figure 2. Top view (a), bottom view (b) and transversal section (c) of the outer part of the outlet with a bore hole (1) for the perfusion media, a bore hole (2) for filling the seeding cylinder, a bore hole (4) for the spacers, a thread (3) for screwing the inner part of the outlet in place and an indentation (5) to keep a gasket in place.

Figure 3. Top view (a), bottom view (b) and transversal section (c) of the inner part of the outlet with a bore hole (1) for perfusion media, a furrow (2) to generate a branched supply channel and a thread (3) for screwing the inner part of the outlet in its outer part.

The distance of the inlet and the outlet is regulated by four spacers made of medical grade steel (Figure 1, (5), d = 4 mm, h = 150 mm) that are positioned in a radius of 38 mm. The BR channels (Figure 1, (1)) with a diameter of 4 mm are arranged parallelly in a distance of 10 mm. The Luer-Lock adapters for the vessel grafts are countersunk into the channels. Two rotatable Luer-Lock connectors are mounted on the inlet and outlet to allow parallel rotational seeding and perfusion procedures. Two
additional Luer-Lock connectors are attached to the lid for filling processes. O-rings are used as sealing elements to ensure fluid transport without leakage. The scaffold carrier is positioned into the seeding cylinder and secured by the closure of the lid.

The seeding device has a maximum capacity of 130 ml, depending on the spacer offset. It has an outer radius of 65 mm and an overall length of 200 mm with a net weight of 600 g.

**Mixer**

For dynamical rotation the seeding cylinder is placed on the mixer (Figure 4). All external parts of the mixer are manufactured from aluminium. The design is based on commercially available roller mixers. Two drive shafts with \( l = 193 \text{ mm} \) and narrowing diameters \( (d = 20 - 6 \text{ mm}) \) are mounted on a base with a distance of 61.5 mm. Grooved ball bearings \((20 \times 32 \times 7 \text{ mm}, 6804 \text{ 2RS})\) and miniature ball bearings \((6 \times 16 \times 15, \text{ S696A 2RS})\) are used for each shaft. The front shaft is driven by a wheel \((D = 68.5 \text{ mm}, d = 58.5 \text{ mm})\) connected to a gear motor with a belt drive. The back shaft is connected with the first shaft by two wheels \((D = 38 \text{ mm}, d = 28.5 \text{ mm})\) and a belt drive. Two O-rings on each shaft and a guardrail prevent the seeding cylinder from slipping during rotation. A retaining bracket, locked by two spring loaded latches, allows prompt fixation of the seeding cylinder.
Figure 4. Top view of the mixer (a) and a transversal section through the front shaft (b). The mixer is composed of two shafts (1), ball bearings (2, 3), and wheels (4, 5) for rotation. An O-ring (6) prevents the seeding cylinder from slipping. A guardrail (7) and a latch (8+10) secure the seeding cylinder on the mixer. The shafts are assembled on a base (9).

Media reservoir

The media reservoir (Figure 5; D = 78 mm, d = 58 mm, H = 110 mm, h = 100 mm) manufactured from PMMA has a capacity of 220 ml. Two Luer-Lock adapters are fixed to the reservoir wall in a distance of 15 mm and 30 mm to the reservoir bottom. The screw cap of the reservoir (D = 80 mm, d = 58 mm, H = 14 mm, h = 7 mm) contains four Luer-Lock adapters in a radius of 44 mm. A gasket ring secures a tight closure of the reservoir.

The reservoir is placed in an aluminium stub (D = 89 mm, d = 79 mm, h = 10 mm). An aluminium ring (D = 120 mm, h = 6 mm) enables the fixation to the ground plate via screws. The reservoir stub provides a gap of 20 mm for M5 Luer-Lock connectors of the reservoir. A M5 Teflon screw on the opposite side of the gap secures the position of the reservoir.
A peristaltic roller pump (WELCO Co. Ltd., Tokyo, Japan) is used for circulating perfusion through the BR. The speed of this pump is regulated by a speed controller (10 A, Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany) with a potentiometer (wirewound linear, 10 kΩ, 2 W, Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany). The pump is combined with an eccentric device (pulser) driven by a DC-motor compressing the scaffold tubes periodically resulting in a pulse right in front of the seeded scaffolds at a defined frequency. This prevents a loss of impulse through the tubes.

A programmable logic controller (PLC, Siemens LOGO! 12/14 RC) was chosen to control all electronic devices by using the Logo! Soft Comfort software. The user panel with display and control buttons enables the control of the program parameters during the experiment.

Purchased parts were made of stainless steel (Luer-Lock connectors, ball bearings), medical grade polymers (tubing material), nylon (vessel cannulas) and nitrile butadiene rubber (NBR; O-rings). Medical laboratory equipment such as Luer-Locks (VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Germany; Hell & Co GmbH, Diespeck, Germany), vessel cannulas (Vieweg GmbH, Kranzberg, Germany), syringe filters (Millex-GS, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), medical tubes (Deutsch & Neumann GmbH, Berlin, Germany) and tube connectors (Vieweg GmbH, Kranzberg, Germany) are CE marked sterile devices and are therefore qualified for the intended application.

2.1.2. Sterilisation
The sterilisation of the bioreactor is restricted to the components in contact with cells and/or cell culture medium; in detail, the seeding cylinder, the scaffold carrier, the reservoir, the tubing system and the adapters. The sterilisation was performed by formaldehyde deposition at 60–70 °C for 7 h. Samples for sterilization verification were aseptically taken at 24, 72 and 96 h after incubation at 37 °C/5 % CO₂ and were screened for contaminations by conventional microbiological evaluation methods (Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, University of Munich, Germany).

2.1.3. Functionality

The bioreactor functionality was checked during a standard sequence as described in 2.4.1 and 2.4.2, in the environment of a standard incubator at 37 °C and 5 % CO₂. The safe connection of all parts and the timed rotation as well as the start of perfusion and pulsation was examined. The cell media was macroscopically inspected for cloudiness or color change through the transparent housings of the reservoir and the seeding device.

2.2. Scaffold materials

Three different scaffold materials were selected for seeding with the bioreactor’s setup: polyurethane (PU), collagen and decellularised human veins (Figure 6).

The PU vessel prostheses were manufactured by the ITV-Denkendorf (Denkendorf, Germany) using spraying technique [23]. Randomly oriented Polyurethane (PU) fibres offer a mean diameter of 1.55 µm and form a tube with a wall thickness of 0.3 mm and an inner diameter of 6 mm. For seeding purpose PU was γ-sterilised at 10 kGy by a certified service provider for medical device sterilisation.

Collagen tubes manufactured by using bovine origin material were supplied from Viscofan Bioengineering (Weinheim, Germany) free of charge. The tubes have an inner diameter of 3.5 mm and a length of 80 mm.

Human vein leftovers from coronary artery bypass operations were obtained from the medical center of the Munich University – LMU (Munich, Germany) for research purposes. Samples were only taken with the patients’ informed consent and were processed anonymously, with no individual patient-related data. The veins were stored in M199 for 24 h and were decellularised in PBS supplemented with 0.5 % Sodium dodecyl sulphate and 0.5 % Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) for 24 h at room temperature (RT). Decellularised homografts were washed six times for 24 h with PBS at RT to remove cellular toxins. After decellularisation the veins could be reseeded in the BR. The inner vein diameter was less than 6 mm with a length of at least 60 mm.

Figure 6. PU tube (a; l = 50 mm, d = 6 mm), a collagen tube (b; l = 60 mm, d = 3.5 mm (with kind permission of Viscofan Bioengineering) and a decellularised vein (c; l = 60 mm, d = varying between 3 and 6 mm).
2.3. Cell source

2.3.1. Cell Isolation and sub culturing

ECs and FBs were isolated from remaining saphenous vein segments, after bypass operations with informed consent from patients. Veins were stored at 4 °C in M199 media (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 1 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U and 5 mg/ ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) for a maximum of 5 d until the isolation process. Segments were cannulised and rinsed with M199 containing 0.2 % heparin (5000 I.E., Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 0.5 % gentamycin (10 mg/ ml, Biochrom AG, Berlin, Germany). For EC isolation, veins were filled twice with 14 mg collagenase II (280 U, Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA) soluted in 10 ml 1 % HSA (human serum albumin, CLS Behring, Bern, Switzerland) and were each incubated for 15 min at in PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany) at physiological conditions in the incubator. Obtained cell suspensions were rinsed out, centrifuged for 7 min at 500 rpm and finally cultivated in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 6 % fetal calf serum (Lonza GmbH, Köln, Germany) and 0.2 % penicillin/streptomycin (Sigma–Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) in standard culture flasks (T12.5 cm², Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) at 37 °C/ 5 % CO₂. For FB isolation a coverslip
method was used. The veins were sliced (1 mm\(^2\)), transferred into a cell culture dish (Nunc GmbH &
Co.KG, Wiesbaden, Germany), and placed below a coverslip fixed by silicone drops (Figure 7).

FBs cultivation was analogously performed to ECs using Fibroblast Growth Medium (FGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 11% fetal calf serum and 0.2% penicillin/streptomycin, respectively. Medium was changed every 2 - 3 days. Cells were passaged at confluency in a ratio of 1:14 at P1 and in a ratio of 1:3 at P2.

**Figure 7.** Coverslip method for FB isolation. Vein slices (1 mm\(^2\), yellow) were positioned in a cell culture dish under a coverslip which is fixed by silicone drops (blue). Outgrowing FBs (grey) reached confluency within two weeks.

2.3.2. Cell characterisation

FB and EC were phenotypic characterised by morphological observation and immunocytochemical staining (ICC) in 8-well-chamber slides (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) using specific antibodies as previously described [49]. Briefly, vascular cells were stained against EC-specific CD31 (10.25 µg/ ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and FB-specific TE-7 (2 µg/ ml, Millipore Corporation BioScience Division, Temecula, CA, USA), respectively according to manufacturer’s protocol using EnVision\(^\text{TM} +\) Dual Link System-HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany).

2.4. Bioreactor setups

2.4.1. Seeding protocol

The scaffold tubes - PU, collagen or human decellularised veins - were clamped to the Luer-Lock adapters in the scaffold carrier and were fixed with surgical threads (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Germany). The seeding device was assembled and filled with FGM. FBs (750.000 cells/ cm\(^2\)) were colonized on the PU lumen by rotating the seeding cylinder on the mixer
according to a defined seeding cycle for 7 h. The cycle comprised rotation for 20 s clockwise and 30 s anti-clockwise with a holding phase of 20 min between each rotation. The seeding device stops at different points after each rotation and allows the cells to attach all over the scaffolds surface. 3 d after cell seeding FGM was replaced by ECGM. ECs (750,000 cells/ cm$^2$) were analogously seeded to the lumen and cultured for another 3 d. Samples were taken for immunohistochemistry (IHC) and scanning electron microscopy (SEM).

2.4.2. Perfusion protocol
A preliminary perfusion experiment was performed with PU scaffolds (n = 3). 24 h after FB-seeding with a rotation of the seeding cylinder as described above, tubes were perfused with a laminar flow of 12 ml/ min (shear stress = 100 dyn/ cm$^2$) for 2 d. After EC-seeding (750,000 cells/ cm$^2$), the tubes were analogously perfused. After 6 d in total, the tubes were exposed to pulsatile flow conditions by actuating the pulse generator for 24 h. After the preliminary perfusion experiments the pump was modified. An optimised perfusion protocol was used. The seeding time was reduced to 6 h and the perfusion period was extended to 36 h with a lower and stepwise increase of the shear stress from 10 to 40 dyn/ cm$^2$, as shown in Figure 8. The pulse generator started 24 h after cell seeding with a break of 24 h of pulsation after EC seeding. Samples were taken for SEM and IHC.

**Figure 8.** Perfusion protocol of the conditioned TEVGs. After FB seeding (t = 0 h) the shear stress was gradually raised to 10 dyn/cm$^2$ (t = 6 h) and 20 dyn/cm$^2$ (t = 24 h). EC were seeded at t = 48 h and were analogously perfused to FB. The pulsation starts at t = 24 h, stops after EC seeding and restarts at t = 72 h. After 96 h the shear stress was finally increased to 40 dyn/cm$^2$ for 1 h.

2.5. Sample Evaluation

2.5.1. Scanning electron microscopy (SEM)
SEM was used to detect the surface topography of native and seeded scaffolds. Specimens were fixed in a solution composed of 456 ml aqua bi-distilled (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Germany), 0.75 ml 1 N hydrochloric acid (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 43.5 ml glutaraldehyde and 5.65 g sodium cocodylatetrihydrate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 4 °C for 24 h at least. Samples were dehydrated in an ascending ethanol series (30 %, 50 %, 70 % and 96 %) and subsequently in 99.9 % ethanol at -20 °C. Specimens were dried at the critical point, sputtered with gold for 180 s at 10⁻⁵ mbar and analysed using a SEM (EVO® LS 10; Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

2.5.2. Immunohistochemistry (IHC)
Immunohistochemical analysis was performed to detect EC and FB after scaffold’s seeding. For this aim, seeded samples were primarily fixed in 4 % formaldehyde (Microcos GmbH, Garching, Germany) for 10 days at 4 °C. Fixed samples were paraffin-embedded and sectioned at 5 µm. Slices were stained against CD31 (ECs; 10.25 µg/ ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and TE-7 (FBs; 2 µg/ ml, Millipore Corporation BioScience Division, Temecula, CA, USA). Specimens were blocked for endogenous peroxidase and incubated with primary antibody at 4 °C overnight. After washing with PBS, samples were covered with biotinylated link for 10 min and HRP Streptavidin-label for 10 min according to manufacturer’s protocol (HRP-Detection Kit, Biozol GmbH, Eching, Germany). Chromogen labelling was conducted for 10 min using AEC-Peroxidase-Substrate Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA). All incubation steps were performed at RT. Cell nuclei were stained with hemalaun (1:4 in PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Controls for non-specific binding of chromogen label were performed by excluding the primary antibody. A bright field microscope was used to observe all stained samples (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

3. Results and Discussion

3.1. Bioreactor Assembly
BRs for the generation of TEVGs are often bulky systems that require handling by highly trained persons [50-52]. The new BR is constructed in a way that allows an assembly in a laminar flow cabinet without any additional tools like screwdrivers or the need of saturation of the scaffolds to assemble them with the BR. As shown in Figure 9, the novel all-in-one BR consists of six components: a seeding device (1) on a mixer (2), a media reservoir (3) a control unit (4) routing the gear motors for the mechanical components (2, 5 and 6), a peristaltic pump (5a) with modifiable speed, adjusted through a potentiometer (5b) and a pulse generator (6). A great benefit of the bioreactor is the compact assembly
of the components on a stable baseplate. This allows an easy and quick handling and transportation which grants stability during all possible processes such as seeding and conditioning process.

**Figure 9.** Rendering of the CATIA data of the all-in-one bioreactor with seeding device (1), rotating mixer (2), media reservoir (3), control unit (4), roller pump (5a) with potentiometer (5b) and pulse generator (6). Tubing and electric wiring are not displayed.

The seeding cylinder (Figure 10) could be implemented with two TEVGs connected to the tubing system for the perfusion procedure. In contrast to other systems [42,53], this dual fixture allows the comparison of different scaffold materials under the same settings. TEVGs (a, red) are located in the cylinder centre and are connected to the media circulation via standard Luer-Lock connectors (a, blue, flow in the direction of the blue arrows). The Luer-Lock connectors (a, blue, flow in direction of the red arrows) on the bioreactors outlet (a, orange and yellow) allow filling processes and media exchange. The scaffold carrier can be adjusted to the length of the TEVG by increasing the spacer distance (a, green). For connecting the vessel grafts to the scaffold carrier, the grafts are fixed with a surgical thread to the male Luer-Lock adapters with tube connectors. The tube connectors are assembled with the female Luer-Lock adapters of the inner parts of the inlet (a, violet) and the outlet
(a, yellow). Finally, the scaffold carrier is inserted into the scaffolds housing and fixed by screwing the cap on top. Manufacturing of the seeding cylinder from PMMA provides optical transparency for macroscopic observation of processes within the unit (b).

**Figure 10.** (a) Sectional view of the seeding cylinder with scaffolds (red), inlet (purple and violet), outlet (orange and yellow), spacers (green), Luer-Lock adapters (blue), housing (grey) and screw cap (brown); (b) final implementation of the seeding cylinder.

### 3.2. Bioreactor Sterility

Culture medium was checked for contamination during the bioreactor run at 24, 72 and 96 h by conventional streak samples. The microbiological evaluation was performed at the Max-von-Pettenkofer-Institute for Hygiene and Medical Microbiology (University of Munich, Munich, Germany). The examinations showed no microbiological contamination in a period of 15 days, indicating the possibility of long-term dynamic studies under sterile conditions.

### 3.3. Bioreactor Function

Luer-Lock adapters with tube connectors ensure an easy connection of the BR components by tubes. After filling the BR with media, sterile degasing of the tubing system can be quickly performed with a syringe via the three-way stopcocks. Using the three-way stopcock directly in front of the seeding device allows an accurate injection of the cell suspension to the scaffold for seeding purpose.
Conditioning of the cells under pulsatile flow conditions raise the tolerance of the tissue-engineered products to shear stress, pressure [31,32,54] and thrombotic events [17]. As shown in Figure 11 the seeding device rotates on the mixer to ensure uniform cell seeding all over the scaffold’s surface. The media reservoir guarantees a sufficient nutrient supply and gas exchange for the cells during cultivation. The flow rate can be adjusted by regulating the pump speed during the run with the potentiometer. The pump allows a slow increase of the shear stress from 5 dyn/ cm² up to 100 dyn/ cm² to enable a cell adaption to shear stress and the development of an ECM. The control unit route a workflow to actuate the pump, the pulse generator and the rotating mixer. The roller pump realises a slightly pulsatile flow through the seeded vascular graft while the pulse generator mimics heartbeat. The combination of these features in one BR which is easy to handle and works properly in a standard incubator is unique.

3.4. Experimental evaluation of the bioreactor

FBs and ECs from the vena saphena magna can be isolated rapidly in large quantities, extensively expanded in culture and can be well recovered after repeated freezing/thawing cycles. As previously described, [55], cells from this source are already used successfully for seeding of PU heart valve scaffolds. Peck et al. [56] described, that the costs for a TEVG grows with its complexity. The sole use of ECs would reduce time and effort in the production of TEVGs. However, Feugier et al. [57] postulated the benefit of coating scaffolds with extra cellular matrix (ECM) proteins to raise ECs
adherence. Furthermore fibronectin, laminin and tenascin-C splice variants, proteins of the ECM, are known to promote neoangiogenesis and endothelial differentiation [58-60]. FBs are mesenchymal cells and synthesise these proteins. Moreover, the adventitia contributes in vascular tone. In this context, Laflamme et al. demonstrated that a tissue engineered vascular adventitia, reconstructed with vascular fibroblasts derived from human adventitia, has the capability of contraction and relaxing [61].

The three scaffold materials for cell seeding compared in this study differ in structure and chemical composition. SEM analysis (Figure 12) of native PU showed a fine meshwork of polyurethane fibres (a), while collagen scaffolds revealed a smooth topography (b). Decellularised veins indicated a smooth surface with cavities of 10 µm to 50 µm (c).

In concert with results from Gulbins et al. [23] seeded PU revealed a cobblestone-morphology (d), indicating the presence of ECs coating. Collagen (e) and decellularised veins (f) showed insufficient cell adherence (arrows pointing on attached cells) resulting in widely bare scaffold surfaces.

In contrast to our findings Buttafoca et al. [62] could create a complete layer of smooth muscle cells within 7 days. But in difference to our collagen tubes they used a hybrid of the copolymer P(DLLA-coTMC) (D,L-lactide and trimethylene carbonate) and collagen for the purpose to generate a scaffold that is more stable than using collagen alone. So the scaffold possessed a clearly porous surface that might have supported the cells adherence.

Although studies showed promising results in animal experiments with decellularised veins as scaffold [63], these findings might not be adaptive to human beings. The veins may have unknown drawbacks due to the toxic residuals that highly affect cell attachments.
Figure 12. SEM analysis of polyurethane (a), collagen (b) and decellularised vein (c) before (a-c) and after (d-f) rotational seeding. Whilst PU shows cell adherence all over the scaffolds surface (d), collagen (e) and decellularised veins (f) are seeded partially only (arrows). These are representative images of an experiment in triplicates.

In line with the SEM results, a confluent cell layer was detected on the PU scaffolds using immunohistochemistry. Staining against FB-specific TE-7 revealed a confluent coverage with FB on PU (Figure 13a). The staining for EC-specific CD31 is partial and weak, indicating that ECs lose cell-cell-contacts [64] during static cultivation on PU.

Collagen (b) and decellularised veins (c) did not show positive staining for TE-7 on their surface, indicating the absence of FBs. In contrast, ECs are evenly spread on collagen (d) while only single cells were found on decellularised veins (e), confirming the findings of SEM analysis.

While the porous nature of PU supports cell attachment, the smooth surface of collagen and decellularised veins seem to hamper cell adherence. This might be explained by shear stress during EC-injection to the scaffold’s lumen, resulting in the loss of insufficient attached FBs on collagen and decellularised veins.
Figure 13. IHC analysis of dynamically seeded PU, collagen and decellularised vein after EC-specific CD31 (a-c, red) and FB-specific TE-7 (d-f, red) staining. Positively stained cells are highlighted with arrows. Cell nuclei were stained with hemalaun. These are representative images of an experiment in triplicates.

As shown in Figure 14, SEM analysis of seeded PU after preliminary perfusion experiments under pulsatile flow conditions (100 dyn/cm²) revealed a disrupted cell layer (a). A closer look showed a smooth cell surface and an orientation in flow direction after dynamic cultivation. IHC analysis demonstrated a partial seeding of PU with slight staining for CD31 (b) and TE-7 (c). Due to these results and the fact that the mean shear stress in small venules tend to be between 20 to 40 dyn/cm² [31], we adapted the perfusion protocol.

Figure 14. SEM (a) and IHC analysis (b = TE-7, c = CD31) of seeded PU after flow exposure (100 dyn/cm²) in the bioreactor system show single cells on the surface of the scaffolds.

Ballermann et al. [31] demonstrated, that ECs cultivated for 9 days with 15 dyn/cm² showed a significantly better adherence than cells cultivated under the same conditions with 1 dyn/cm². In
dependence on this we started conditioning with a shear stress of 10 dyn/ cm² and then increased it stepwise up to 40 dyn/ cm². In contrast to other groups [42,65] we cultivated the cells with an up to 4-fold higher shear stress. As shown in Figure 15, SEM analysis of seeded PU revealed a confluent cellular coating of the scaffolds (a). After flow exposure, the cell layer is flattened and smoother than under static conditions. IHC showed a defined cell multilayer with moderate staining for TE-7 (b) and a high expression of CD31 (c)

Figure 15. SEM (a) and IHC analysis (b = TE-7, c = CD31) of seeded PU after flow exposure (10 to 40 dyn/cm²) in the all-in-one bioreactor system show a confluent and flattened lining with ECs (a, c) and FBs (b). These are representative images of an experiment in triplicates.

4. Conclusions

The new developed BR for the use in a conventional incubator combines seeding and conditioning of two vascular prostheses in a unique fashion. It provides a new tool for simultaneous seeding, conditioning and perfusion of multiple small-diameter TEVGs. This system allows the development of cell-based cardiovascular devices for in-vitro evaluation studies as well. The results of the first experiments demonstrated a successful and easy sterile process that allows cell evaluation in a period of 5 days. This first proof of concept offers further approaches to a routine application in TEVG laboratory research processes. Future experiments are still required to evaluate the influence of flow and pulse rates on the formation of stable layers on various scaffold materials. Additionally the impact of these parameters on cellular gene expression and scaffolds mechanics has to be assessed.

Acknowledgments

We would like to thank Viscofan Bioengineering GmbH for kind appropriation of collagen tubes.

Author Contributions
Julia Schulte performed all cell culturing experiments, optimised the bioreactor, wrote the manuscript and performed data analyses. Anja Friedrich developed the prototype of the bioreactor and supported the writing of the manuscript. Trixi Hollweck supported the writing of the manuscript and data analyses. Fabian König supported and implemented changes to the bioreactor setup by using a CATIA Software. Markus Eblenkamp supervised the technical construction done by Anja Friedrich. Andres Beiras-Fernandez supported the whole project from a clinical point of view. Cornelia Fano developed and optimised the polyurethane scaffolds. Christian Hagl is the clinical director of the heart surgery who has provided essential clinical input to the project. Bassil Akra conceived the experimental study, was the project owner, the device inventor, the group leader and overall supervisor. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.