

Aus der Arbeitsgruppe
Tissue Engineering und kardiovaskuläre Medizintechnik
der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Christian Hagl

**Dezellularisierte biohybride Scaffolds auf Polyurethan-Basis
und ihre In-vitro-Evaluation für den Einsatz als Implantat
im kardiovaskulären Tissue Engineering**

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

vorgelegt von
Matthias Wolfgang Helm
aus
München

2022

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hagl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ali M. Ertürk
Prof. Dr. Mohammad-Mehdi Shakibaei

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Nikolaus Thierfelder

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
2. KURZZUSAMMENFASSUNG	7
3. EINLEITUNG	9
3.1 GRUNDPRINZIPIEN DES TISSUE ENGINEERINGS	9
3.2 GESCHICHTE UND SPEZIALISIERUNG DES TISSUE ENGINEERINGS	10
3.3 EINSATZGEBIETE DES KARDIOVASKULÄREN TISSUE ENGINEERINGS	10
3.4 SYNTHETISCHE, BIOLOGISCHE UND BIOHYBRIDE SCAFFOLDS	13
3.5 ZELLQUELLEN IM KARDIOVASKULÄREN TISSUE ENGINEERING	15
3.6 EZM – EINE IDEALE GRUNDLAGE MIT VIELSEITIGER FUNKTION	16
3.7 DEZELLULARISIERUNG IN THEORIE UND PRAXIS	18
4. ZIELSETZUNG UND VERSUCHSABLAUF	20
5. MATERIAL UND METHODEN	22
5.1 ELEKTROGESPONNENES POLYURETHAN	22
5.2 ZELLKULTUR	23
5.2.1 VERWENDUNG HUMANER VENENGRAFTS UND RAHMENBEDINGUNGEN	23
5.2.2 ISOLIERUNG VON ENDOTHELZELLEN AUS VENENGRAFTS	23
5.2.3 ISOLIERUNG VON FIBROBLASTEN AUS VENENGRAFTS	25
5.2.4 TRYPSINIEREN KONFLUENTER ZELLKULTURFLASCHEN	25
5.2.5 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON ZELLINIEN	27
5.2.6 MANUELLE BZW. HALBAUTOMATISCHE ZELLQUANTIFIZIERUNG	28
5.3 HERSTELLUNG ZELLFREIER BIOHYBRIDER SCAFFOLDS	29
5.3.1 STATISCHE FB-BESIEDLUNG ZUR GENERIERUNG EINER EZM AUF PU	29
5.3.2 WEITERVERARBEITUNG, PROBEN UND LANGZEITLAGERUNG	30
5.3.3 DEZELLULARISIERUNGSPROTOKOLLE	32
5.4 DYNAMISCHE REZELLULARISIERUNG MIT ENDOTHELZELLEN	33
5.5 REZELLULARISIERUNG DURCH AUFNÄHEN VON VENENGRAFTS	34
5.6 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	36
5.6.1 ENTWÄSSERUNG UND KRITISCH-PUNKT-TROCKNUNG	36
5.6.2 IONENSTRAHLSPUTTERN	37

5.7	IMMUNHISTOCHEMIE	37
5.7.1	ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	37
5.7.2	FÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN MITTELS SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	38
5.8	FLUORESZENZMIKROSKOPIE VITALER UND LETALER ZELLEN	40
6.	ERGEBNISSE	43
6.1	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	43
6.1.1	NATIVES PU IM VERGLEICH ZUM ZUSTAND NACH FB-BESIEDELUNG	43
6.1.2	DEZELLULARISIERUNG UND EZM-ERHALT	45
6.1.3	ERFOLG DER DYNAMISCHEN REZELLULARISIERUNG MIT EC	46
6.1.4	BESCHAFFENHEIT DER SCAFFOLDS NACH LAGERUNG ÜBER 365 TAGE	47
6.1.5	ERGEBNIS DES AUFNÄHENS VON VENENGRAFTS	48
6.2	IMMUNHISTOCHEMIE	50
6.2.1	NACHWEIS VON FB- UND EZM-MARKERN NACH BESIEDELUNG DES PU	50
6.2.2	DEZELLULARISIERUNG UND EZM-ERHALT	52
6.2.3	ERFOLG DER DYNAMISCHEN REZELLULARISIERUNG MIT EC	54
6.2.4	BESCHAFFENHEIT DER SCAFFOLDS NACH LAGERUNG ÜBER 365 TAGE	55
6.2.5	ERGEBNIS DES AUFNÄHENS VON VENENGRAFTS	56
6.3	ZÄHLUNG VERBLIEBENER ZELLEN NACH BESIEDELUNGSVERSUCHEN	57
6.4	FLUORESZENZMIKROSKOPIE VITALER UND LETALER ZELLEN	58
7.	DISKUSSION	60
7.1	MODALITÄTEN BEI DER ENTWICKLUNG BIOHYBRIDER SCAFFOLDS	60
7.2	QUALITÄT UND NEBENBEFUNDE DER EZM-HERSTELLUNG	63
7.3	ERKENNTNISSE NACH DEZELLULARISIERUNG	65
7.4	REZELLULARISIERBARKEIT DER BIOHYBRIDEN SCAFFOLDS	68
7.5	HALTBARKEIT UND REPRODUZIERBARKEIT DER BIOHYBRIDEN SCAFFOLDS	70
8.	ZUSAMMENFASSUNG	73
9.	LITERATURVERZEICHNIS	75
10.	ANHANG	83
11.	DANKSAGUNG	94

12. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG **95**

13. PUBLIKATIONSLISTE **96**

Abkürzungsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis

a. d.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarboxol
AK	Antikörper
c	Konzentration
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FB	Fibroblasten
FCS	Fetal Calf Serum
FGM	Fibroblast Growth Medium
gtt	Tropfen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
IHC	Immunhistochemie
LD	Live / Dead (Vital-Letal-Färbung)
M199	Medium 199 Earle's
PenStrep	Penicillin / Streptomycin
PI	Propidiumjodid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP	Polypropylen
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SD	Sodium deoxycholate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TE	Tissue Engineering
TX	<i>Triton X 100</i> (Alkylphenylpolyethylenglykol)

2. Kurzzusammenfassung

Hintergrund: Biokompatible Zellträger auf Basis synthetischer Materialien dienen im kardiovaskulären Tissue Engineering (TE) als vielversprechender Ansatz zur Entwicklung moderner und sicherer Implantate für den klinischen Einsatz. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines neuartigen biohybriden Scaffolds auf Eigenschaften, die für die Anwendbarkeit in vivo besonders bedeutsam erscheinen.

Material und Methoden: Betrachtet wurde ein neu entwickelter biohybrider Scaffold (n = 5) aus Polyurethan (PU) und einer Extrazellulärmatrix (EZM). Die EZM wurde auf dem Zellträger von $7,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ Fibroblasten (FB) unter 10-tägiger Inkubation synthetisiert. Als Zellquelle fungierten humane Venae saphenae magnaе. Die Dezellularisierung erfolgte nach festen Protokollen mit ionischen und nicht-ionischen Detergenzien in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS): Natriumdesoxycholat (SD) 0,5 % + Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,5 % über 16 h (Gruppe A) bzw. SDS 0,5 % (16 h) + Alkylphenylpolyethylenglykol (*Triton*® X-100, TX) 0,5 % über 0,5 h (Gruppe B). In-vitro-Versuche beleuchteten die Attraktivität der Scaffolds für eine zelluläre Re-Besiedelung. Betrachtet wurde hier eine dynamische Inkubation (n = 10) mit $1,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ Endothelzellen (EC) und eine 21-tägige Inkubation nach Befestigung humaner Venengrafts auf den Scaffolds (n = 5). Weiterhin wurde der Strukturerehalt der Scaffolds nach Lagerung über 365 Tage in PBS bei 4 °C untersucht (n = 5). Zur Auswertung an unterschiedlichen Zeitpunkten dienten die Immunhistochemie (IHC) mit zell- und EZM-spezifischen Antikörpern, die Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie die Fluoreszenzmikroskopie eines Vital-Letal-Assays (= Live/Dead, LD).

Ergebnisse: Die erfolgreiche Erzeugung der Scaffolds wurde mit dem IHC-Nachweis der EZM-Marker Fibronectin, Kollagen I / IV, Laminin und Elastin nachgewiesen. Die REM zeigte eine homogene Bedeckung der Scaffold-Oberflächen. Nach Dezellularisierung konnte ein weitgehender Erhalt der EZM ohne eindeutigen Vorteil für eines der beiden Protokolle gezeigt werden. Die erzeugten Scaffolds zeigten sich bei der Rezellularisierung mittels dynamischer Inkubation im Vergleich mit unbehandeltem PU signifikant überlegen. Entsprechende Nachweise erbrachten die EC-Marker CD31 und VE-Cadherin in der IHC, die Darstellung einer eindeutigen Polarität in der REM und das durch eine halbautomatische Zellzählung quantifizierte Verteilungsmuster angewachsener Zellen in der LD-Färbung.

Kurzzusammenfassung

Nach 365 Tagen Lagerung konnte ein insgesamt guter Erhalt der Scaffolds festgestellt werden. Nur in geringem Ausmaß bestanden Hinweise auf beginnende Abbauprozesse in der EZM: Die Intensität von IHC-Signalen zeigte sich leicht rückläufig und der Aspekt der EZM im REM ließ eine leichte Auflockerung erkennen. Das unverändert große Potenzial für die weitere Verarbeitung belegte das nach dem Aufnähen eröffneter Venengrafts auf den gelagerten Scaffolds großflächige, nach 21 Tagen vielerorts konfluente, Wachstum von FB und EC.

Fazit: Die Erzeugung biohybrider Scaffolds aus PU und einer von FB synthetisierten EZM in vitro ist zuverlässig reproduzierbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Dezellularisierungsprotokollen mit ionischen und nicht-ionischen Detergenzien lässt sich nicht zeigen. Es bestehen deutliche Hinweise auf ein gutes Potenzial zur Re-Endothelialisierbarkeit der erzeugten Scaffolds in vivo. Verlaufskontrollen der Scaffold-Struktur lassen zudem die Eignung potenzieller Implantate für einen wünschenswerten „Off-the-shelf“-Einsatz erwarten.

3. Einleitung

3.1 Grundprinzipien des Tissue Engineerings

Mit dem Begriff „Tissue Engineering“ (TE) wird eine aufstrebende, interdisziplinäre Forschungsdisziplin an der Schnittstelle von Medizin und Ingenieurwesen bezeichnet. Seit seiner Einführung in den 1980er-Jahren beschäftigt sich TE damit, Biomaterialien und Wachstumsfaktoren *in vitro* zu kombinieren, um künstliche Gewebe für die Anwendung *in vivo* zu entwickeln. Hierfür werden die Erkenntnisse von Zell- und Molekularbiologie, Physiologie und Biochemie sowie Materialforschung und Ingenieurwissenschaften zusammengeführt, um unterschiedlichste regenerative Medizinprodukte zu erzeugen. [1, 2]

Im günstigsten Fall gelingt es TE, anpassungsfähige und mit dem Organismus wachsende Therapieansätze für all jene Patienten anzubieten, die einen Ersatz geschädigter und erkrankter Zellen, Körpergewebe oder Organe benötigen. Für solche Anwendungen etablierte Behandlungen haben bisher oft gravierende Nachteile, z. B. multiple Re-Operationen als Folge von Degradation bei biologischen Grafts oder die Thrombogenität und Abstoßungsgefahr bei rein synthetischen Prothesen. [3] Zwar sieht sich TE mit großen Herausforderungen bei der klinischen Anwendung im Menschen konfrontiert. Produkte des Forschungszweiges werden aber bereits vielerorts erfolgreich eingesetzt, so z. B. in Form von Haut-, Knochen- oder Knorpelregeneraten. [4]

Ein klassischer Ansatz von TE besteht darin, mit lebenden Zellen vitale Gewebe zu synthetisieren, die ihren biologischen Vorbildern möglichst exakt nachempfunden sind. Dem gegenüber stehen regenerative Konzepte, die im Zielorganismus vor Ort beispielsweise Chemokine freisetzen oder induzieren, um den (Wieder-) Aufbau von Geweben und den Heilungsprozess zu unterstützen. Eine der Zellaussaat und -differenzierung dienende Matrix oder ein anderes geeignetes Trägergerüst (Scaffold) können jeweils die Gestalt implantierter Gewebe mit Blick auf das gewünschte Einsatzgebiet formen. Bioreaktoren können auf dieser Grundlage eine Massenproduktion künstlicher Gewebe ermöglichen. [5, 6]

3.2 Geschichte und Spezialisierung des Tissue Engineerings

Pioniere auf dem Gebiet des TE waren die Brüder Charles und Joseph Vacanti, deren Bemühungen auf dem Gebiet der Knorpelzüchtung 1997 in der Vorstellung der so genannten „Vacanti-Maus“ gipfelten: Ihnen war die Nutzung eines Labortiers als Bioreaktor zur Erzeugung von Knorpelgewebe aus bovinen Chondrozyten gelungen. Grundlage des künstlichen Gewebes war ein abbaubares Polymer, das der Ohrmuschel eines dreijährigen Kindes nachgebildet worden war. [7]

Schon früh war die Herz-Kreislauf-Medizin eine treibende Kraft hinter der Entwicklung der neuen Technik. So stellten Zilla et al. 1987 die seinerzeit noch eher ernüchternden Daten von 18 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit vor, für deren Bypass-Operationen ein mit autologen Endothelzellen (EC) besätes Polymer zum Einsatz gekommen war [8]. Im Lauf der Jahre diversifzierten sich Zellquellen, Methoden und Einsatzgebiete immer weiter. Heutzutage entwickelt das kardiovaskuläre TE flächige Patches, Gefäßprothesen und künstliche Herzklappen gleichermaßen und arbeitet an der Aufbereitung ganzer Organe, um Alternativen zu knappen humanen Transplantaten zu finden [9].

3.3 Einsatzgebiete des kardiovaskulären Tissue Engineerings

Kardiovaskuläre Erkrankungen dominieren in Europa die Mortalitätsstatistik. Trotz Fortschritten bei der Therapie bleiben sie in vielen Ländern die häufigste Todesursache noch vor Krebserkrankungen. So entfallen in den 53 Mitgliedsstaaten der Europäischen Region der WHO etwa 45 % der erfassten Sterbefälle, umgerechnet rund vier Millionen Ereignisse pro Jahr, auf diese Diagnosegruppe. [10]

Das im stetigen Wandel begriffene kardiovaskuläre TE birgt angesichts dieser medizinisch wie ökonomisch bedeutsamen Krankheiten großes Potenzial für die klinische Anwendung. Ein hervorragendes Beispiel ist die Schnittstelle von Kinderkardiologie und Herzchirurgie: Angeborene Fehlbildungen des Herzens und der großen Gefäße sind die häufigsten kongenitalen Defekte und eine der bedeutendsten Ursachen von Kindersterblichkeit in modernen Industriestaaten [11]. Die rechtzeitige Erkennung dieser Krankheitsbilder führt häufig zu komplexen Interventionen. Diese bedürfen teils knapper Ressourcen, so z. B. bei der 1967 von

Einleitung

Ross etablierten Operation zum Ersatz der Aorten- oder Mitralklappe, in deren Rahmen die zur Reparatur verwendete patienteneigene Pulmonalklappe durch Allografts von Verstorbenen ersetzt wird (Abbildung 3-1). [12]

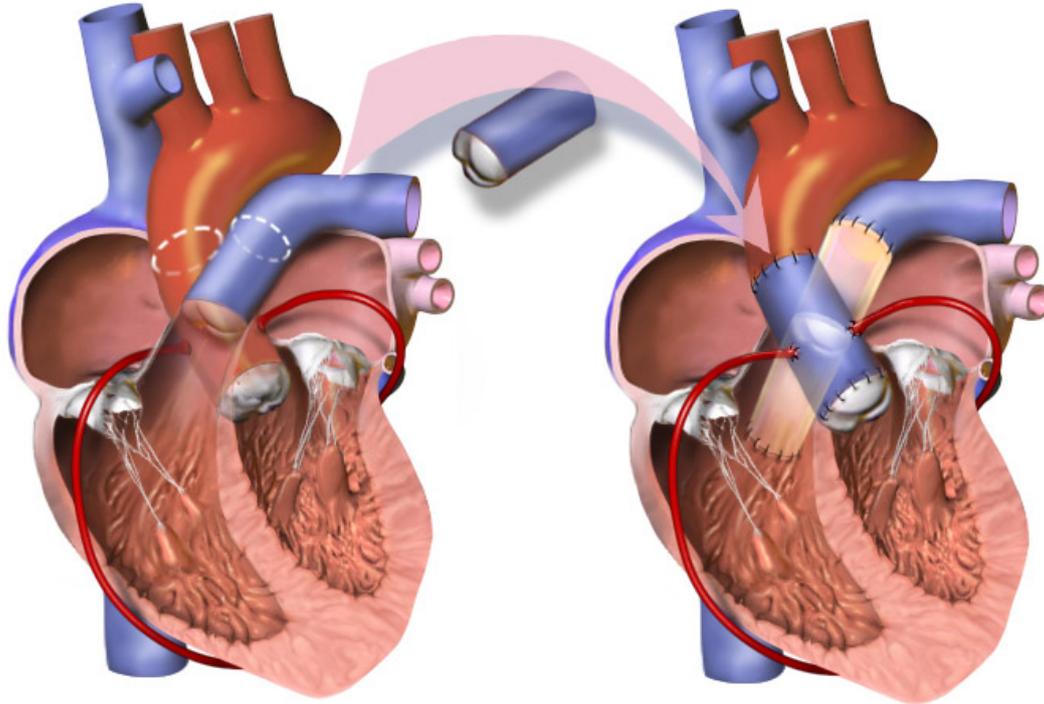


Abbildung 3-1 Schemazeichnung der Operation nach Ross: Die patienteneigene Pulmonalklappe (= pulmonaler Autograft, blaues Fragment, Mitte) wird entnommen und nach Entfernung der erkrankten Aortenklappe in Aortenposition eingenäht (Pfeil, rechts). Die entnommene Pulmonalklappe muss durch eine Spenderklappe ersetzt werden (halbtransparent, rechts). [13]

Zwar besteht die Möglichkeit eines rein *synthetischen* Klappenersatzes. Dieser birgt jedoch Problempotenzial durch ein fehlendes Wachstum mit dem Patienten oder die Notwendigkeit einer Antikoagulation, die Blutungskomplikationen begünstigt. Zu den Herausforderungen beim Einsatz *biologischer* Transplantate wiederum zählen infektiologische und immunologische Risiken sowie die Notwendigkeit belastender Re-Operationen durch Degeneration. [14] TE hat daher den Anspruch, unbegrenzt verfügbare Prothesen ohne diese Schwächen zu generieren, die sich nahtlos ins Empfängergewebe einfügen und körpereigene Regenerations- und Wachstumsvorgänge begünstigen. Geeignete Voraussetzungen für die Adhäsion, Nährstoffversorgung, Ausbreitung und Differenzierung von Zellen *in vivo* bereitzustellen, vorzugsweise in Form einer belastbaren Extrazellulärmatrix (EZM), ist nur eine der zahlreichen Anforderungen an solche Prothesen [15].

Einleitung

Mittels TE erzeugte Herzklappen (Tissue-engineered heart valves, TEHV) versprechen bei Verwendung geeigneter Scaffoldmaterialien und Zellquellen leichte Implantierbarkeit, gute Biokompatibilität und eine nicht thrombogene, stabile Struktur. Eine Herausforderung besteht darin, den kontrollierten biologischen Abbau und wünschenswerte Remodellierungsprozesse in vivo zu unterstützen: So entstünde Gewebe, das sich nicht mehr von körpereigenem unterscheidet. [16]

Neben Prothesen zum Herzklappen- oder Gefäßersatz verfolgt TE auch die Entwicklung von Patches. Bedeutsam sind diese beispielsweise beim Verschluss hochprävalenter ventrikulärer Septumdefekte [17]. Ebenfalls eingesetzt werden sie bei Herzklappenrekonstruktionen, der arteriellen Switch-Operation bei Transposition der großen Gefäße oder der komplexen Korrektur einer Fallot'schen Tetralogie [18, 19]. Eine weitere verheißungsvolle Anwendung ist die Entwicklung schlagender menschlicher Herzmuskelpatches, die Organismen bei der Erholung von einem Myokardinfarkt unterstützen sollen. [20] Trotz Fortschritten bei der medizinischen Versorgung bleiben myokardiale Ischämien eine führende Todesursache in industrialisierten Gesellschaften mit einem Anteil von bis zu 15 % an den erfassten Sterbefällen [21]. Bei Patienten nach Myokardinfarkt soll auf das so genannte „Remodeling“ Einfluss genommen werden, einen Prozess unter Beteiligung von EZM, der durch narbigen Umbau zu einem mechanischen Funktionsverlust mit beträchtlicher Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion führen kann. Die Folge ist eine prognoselimitierende Herzinsuffizienz. [22-25] Diesbezüglich häufen sich positive Ergebnisse in Tiermodellen auf Basis unterschiedlichster Zellträger und Zellen: So beobachteten Gao et al. am Schwein bei Einsatz eines Fibringerüsts mit pluripotenten menschlichen Stammzellen signifikante Verbesserungen im Bereich der Pumpfunktion, der Myokardhypertrophie und des Zelluntergangs [20]. Kameli et al. fanden in der Ratte nach Implantation von Patches aus zellfreiem Perikard und autologen mesenchymalen Stammzellen Hinweise für eine vermehrte Gefäßneubildung und Regeneration von Kardiomyozyten [26].

3.4 Synthetische, biologische und biohybride Scaffolds

Beim Vergleich der vorherrschenden Strategien im TE finden sich auf der einen Seite die Bemühungen um vitale Konstrukte, d. h. Scaffolds mit einer intakten zellulären Komponente. Dem gegenüber steht das sich überaus dynamisch entwickelnde Feld der zellfreien (regenerativen) Ansätze [22, 27].

Für vitale wie auch für azelluläre regenerative Ansätze stehen dem TE zwei Hauptgruppen von Materialien als Grundlage zur Verfügung: In der Natur vorkommende, biologische Materialien sowie synthetische Erzeugnisse. Beiden Gruppen wohnen individuelle Vor- und Nachteile inne, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Eine exakte Trennung bildet jedoch immer weniger die Forschungsrealität ab, die sich durch zunehmend komplexe Synthese-, Besiedelungs- und Dezellularisierungstechniken stetig weiterentwickelt. Zahlreiche Produkte des TE sind heute biohybride regenerative Scaffolds, also azelluläre Gebilde mit sowohl biologischen, als auch synthetischen Komponenten [28, 29].

Biologische Scaffolds im engeren Sinne beruhen auf nativem Gewebe oder von Zellen gebildeten Matrices, ggf. erweitert um Modifikationen wie eine zusätzliche Zellbesiedelung. Gängige Annahme ist, dass solche Scaffolds auch von xenogenen Empfängern toleriert werden und durch ihre Zellaffinität den Wiederaufbau von Geweben begünstigen [30]. Jedoch sind über die klassische Immunantwort hinaus die Mechanismen der Biokompatibilität im Empfängerorganismus noch nicht umfassend geklärt. So wurde jüngst das Konzept der „sterilen Inflammation“ durch Biomaterialien postuliert, das eine begrenzte langfristige Haltbarkeit biologischer TE-Implantate erklären könnte [31].

Synthetische Stoffe ermöglichen eine große Gestaltungsfreiheit, sodass Scaffolds dieses Ursprungs prinzipiell nach Belieben für das jeweils gewünschte Einsatzgebiet angepasst werden können. So ermöglichen Polymere wie Polypropylen (PP) oder Polyurethan (PU), dass Produkte des TE ähnliche biochemische und mechanische Eigenschaften aufweisen wie die entsprechenden körpereigenen Gewebe. Im Bereich des kardiovaskulären TE gilt dies in besonderem Maße für PU, das hinsichtlich Elastizität und Zugfestigkeit den zu ersetzenden Geweben sehr nahekommt. [32, 33]

Einleitung

Als sehr gut bioverträgliches Material hat sich PU bereits über Jahrzehnte hinweg als Bestandteil der unterschiedlichsten Implantate in der klinischen Medizin etabliert – von der Augmentations-Mammoplastik bis hin zur operativen Versorgung von Meniscus-Läsionen [34, 35].

Herausfordernd gestaltet sich bei synthetischen Scaffolds die Nachbildung einer möglichst natürlichen extrazellulären Umgebung. Diese ist Voraussetzung für ein optimales Wachstum und die Organisationsfähigkeit wachsender Gewebe. Auch zur Vermeidung von Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus und für das rasche Einheilen einer implantierten Prothese in situ (z. B. mittels Endothelialisierung) ist dieser Faktor bedeutsam. Synthetische Scaffolds werden daher oftmals beschichtet und bioaktiv gemacht, um wachstumsfördernde Signale auszulösen. [36, 37]

Biohybride Scaffolds vereinen die Stärken biologischer und synthetischer Materialien. Sie bedienen sich oft der biologischen Eigenschaften einer EZM (vgl. 3.6) und nutzen Mechanismen, die z. B. auch bei der Wundheilung eine Rolle spielen. [38, 39] Die Entwicklung biohybrider Scaffolds aus biologischen und synthetischen Bestandteilen ist inzwischen zu einem weiten Feld geworden, das unterschiedlichste innovative Technologien miteinbezieht: So berichteten Dong et al. kürzlich von der In-vitro-Kombination bioaktiver Nanopartikel und mesenchymaler Stammzellen für Patches in der Myokardinfarkt-Therapie (vgl. 3.3). Die Nanopartikel sollen dabei auf Basis einer EZM das Überleben und die Proliferation von Kardiomyozyten fördern [40]. Andere Ansätze beabsichtigen, für Patches in der Infarkttherapie die aufstrebende Technik des 3D-Drucks mit dem Einsatz pluripotenter Stammzellen zu vereinen [41].

Kehrt man zurück zur eingangs schon erwähnten Unterscheidung zwischen zellhaltigen und zellfreien TE-Strategien, empfiehlt sich vor der Festlegung auf ein Verfahren die gründliche Betrachtung des vorgesehenen Anwendungsgebiets: Vitale, zellhaltige Ansätze versprechen zwar günstige Ausgangsbedingungen für eine rasche Assimilation von Scaffolds in vivo, beispielsweise durch eine Förderung der Endothelialisierung im kardiovaskulären System. Eine Zellbesiedelung vor Implantation birgt jedoch auch beträchtliche Probleme, nicht zuletzt da die Einbringung einer Prothese in den Körper je nach Einsatzgebiet mechanisch sehr

Einleitung

belastend sein kann. Massenhafter Zelluntergang auf einem zellbesiedelten Scaffold kann in vivo erhebliche inflammatorische Prozesse auslösen, die das Einwachsen von Prothesen im Gegenteil sogar behindern [42]. Dazu passende Beobachtungen machten beispielsweise König et al. bei der Simulation einer Katheter-gestützten Implantation zellbesiedelter biohybrider Aortenklappen [43].

Solchen Gefahren sind *zellfreie* biohybride Scaffolds auf Kunststoffbasis in geringerem Maße ausgesetzt. Beispielhaft sei hier die von Stankus et al. 2008 beschriebene erfolgreiche Verknüpfung eines synthetischen Elastometers mit der EZM porciner Harnblasen genannt [44]. Regenerative Ansätze werden jedoch in vielen Fällen auch ohne Einbezug synthetischer Materialien verfolgt. Konkret gibt es zum Beispiel intensive Forschungsbemühungen mit dem Ziel, tierische Materialien unter Erhalt ihrer natürlichen Matrices zu dezellularisieren [45]. Ein Beispiel aus der jüngeren Vergangenheit ist die Untersuchung von König et al. aus dem Jahr 2019 zur Dezellularisierung von porcinen Aortenwänden [46].

3.5 Zellquellen im kardiovaskulären Tissue Engineering

Eine der grundlegendsten Weichenstellungen beim TE stellt die Identifizierung geeigneter Zellarten dar, auf deren Basis Scaffolds erzeugt werden sollen. Legt man sein Augenmerk hierbei angesichts der beabsichtigten klinischen Anwendung in erster Linie auf humane Zellen, stehen ethische Fragen im Raum. Die dahingehend besonders stark diskutierten embryonalen Stammzellen bringen außerdem Herausforderungen wie Immunogenität und Entartungspotenzial mit sich [47]. Die Verwendung mesenchymaler Stammzellen aus Nabelschnüren wiederum wirft die Frage auf, wie groß der Einfluss von Variablen wie dem Gestationsalter oder möglichen Infektionen auf die Verwertbarkeit solcher Materialien ist [48].

Ethisch unbedenkliche adulte Stammzellen dagegen, die im Sinne einer heterologen Transplantation für Prothesen herangezogen werden könnten, würden Patienten zwangsläufig den Gefahren einer immunsuppressiven Therapie aussetzen [49].

Dies könnte sich auch für die Nutzbarkeit innovativer Ansätze als limitierend erweisen, die etablierte Medizinprodukte aus dem klinischen Alltag als neuartige Zellquellen erschließen wollen. Die Untersuchung von Nathusius et al. demonstrierte beispielsweise die erfolgreiche Gewinnung von FB und EC aus Kardiotomiereservoirs nach OPs mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine [50].

Einleitung

Viele klinische Stimmen sprechen sich in Zusammenschau von Vor- und Nachteilen für autologe Ansätze aus und fordern, dass ein idealer Tissue-engineerter Scaffold hinsichtlich des zugrunde liegenden Zellmaterials mit dem Empfänger genetisch übereinstimmen sollte [51]. Selbst ältere Patienten können im Rahmen daraus abgeleiteter Therapiestrategien beispielsweise von der Transplantation adulter Stammzellen aus dem eigenen Knochenmark profitieren. Dies stellten Westphal et al. bei der Behandlung der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie fest [52]. Auch Lu et al. bekräftigten bei der Erzeugung einer autologen EZM auf Polyactid-co-Glycolid autologe Zellquellen als Idealfall hinsichtlich Biokompatibilität [53].

3.6 EZM – eine ideale Grundlage mit vielseitiger Funktion

Die chemischen, physikalischen und mechanischen Verhältnisse im Umfeld lebender Zellen bestimmen deren Entwicklung und Verhalten entscheidend mit. Vielzellige Organismen wie der Mensch verfügen zur Förderung günstiger Bedingungen daher über eine außerhalb von Zellen gelegene, dreidimensional organisierte Substanz, die gleichzeitig formgebend für Organe und den Bewegungsapparat ist: Die extrazelluläre Matrix (EZM). Sie nimmt mit ihren vielfältig vernetzten Makromolekülen Einfluss auf die Funktion unzähliger Gewebe und die Entscheidung über das Fortbestehen oder die Apoptose von Zellen [54].

Bestandteile der EZM sind neben Kollagenen, Glykosaminoglykanen, Elastin, Fibronectin und Lamininen noch zahlreiche weitere Glykoproteine. Eine typische Anordnung dieser Bestandteile zu einem geordneten Netzwerk zeigt stark vereinfacht Abbildung 3-2.

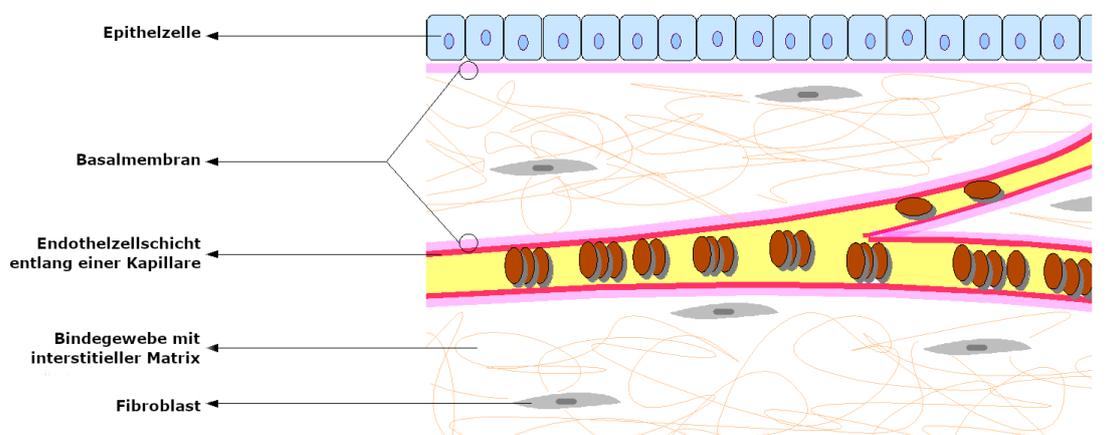


Abbildung 3-2 Vereinfachte grafische Darstellung der Extrazellulärmatrix (= Basalmembran + Bindegewebe mit interstitieller Matrix) und ihrer Lagebeziehung zu Umgebungsstrukturen und Zellen (modifiziert auf Basis von [55])

Einleitung

Sämtliche Zellarten, darunter FB und EC, synthetisieren EZM-Bestandteile, werden aber umgekehrt auch von Proteinen der Matrix beeinflusst. Diese Interaktion, über die die EZM beispielsweise Zellen zur lokalen Ansiedelung bewegen kann, wird maßgeblich über eine umfassend untersuchte Gruppe zellulärer Oberflächenrezeptoren vermittelt, die Integrine [56]. Auch die Regulierung von Zellwachstum und -verhalten durch lösliche Wachstumsfaktoren beruht zu einem erheblichen Teil auf der EZM, die über spezielle Bindestellen ihrer Proteoglykane mit diesen Botenstoffen in Wechselwirkung tritt [57].

Über die Regulation von Zellwachstum, -ausbreitung und -differenzierung hat die EZM eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung von Körperfunktionen. Daraus ergibt sich zugleich, dass sie auch Anteil an der Pathogenese unterschiedlichster Erkrankungen bis hin zu Krebsleiden haben kann: Ein ständiger struktureller Wandel und die Anpassung durch enzymatische, hormonelle oder zelluläre Einflüsse machen das komplexe EZM-Netzwerk gleichzeitig empfindlich für eine Vielzahl von Störfaktoren, was bei der Entartung von Zellen relevant sein kann. [58]

Wegen der vielfältigen Funktionen von EZM bemüht sich das TE schon seit geraumer Zeit darum, sie für Scaffolds nutzbar zu machen. Die synergistischen biochemischen und biomechanischen Wechselwirkungen zwischen Zellen und Matrixbestandteilen sind Gegenstand einer Übersichtsarbeit von Nakayama et al. aus dem Jahr 2014, die speziell das kardiovaskuläre TE behandelt. Auf Basis pluripotenter Stammzellen werden darin diejenigen Eigenschaften von EZM betont, die über Anpassungen des Zytoskeletts und Kraftübertragung auf den Zellkern ein Remodeling und Differenzierungsprozesse auf Zellebene anstoßen. [59]

Besonders relevant und vermehrt im Fokus von Forschungszweigen wie dem TE ist die Rolle der EZM insbesondere auch bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen [60]. Exemplarisch seien hier nur zwei für das kardiovaskuläre TE besonders relevante Zusammenhänge genannt: Eine Kollagen-IV-abhängige Differenzierung pluripotenter Stammzellen in Zellen des kardiovaskulären Systems ist zumindest im Mausmodell nachgewiesen; festzustellen waren in der Folge funktionstüchtige Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und EC [61].

Einleitung

Auch fördert beispielsweise Fibronectin abhängig von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) eine verstärkte Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen zu EC. [62] Es liegen somit vielfältige Gründe vor, EZM als ideale Komponente von Scaffolds im kardiovaskulären TE zu betrachten.

3.7 Dezellularisierung in Theorie und Praxis

Zur Gewährleistung der Biokompatibilität von TE-erzeugten Scaffolds muss vor Implantation eine Dezellularisierung erfolgen, sofern im Herstellungsprozess heterologe, also empfangnerfremde, Zellen zum Einsatz gekommen sind. Dieser Schritt soll Zellen im Idealfall restlos vom Scaffold entfernen, jedoch Struktur, Belastbarkeit und biologische Aktivität des EZM-Gerüsts bestmöglich erhalten. Die Herausforderung besteht darin, mit optimaler Kombination physikalischer, chemischer und biologischer Verfahren ein Gleichgewicht zwischen diesen Zielen einzustellen. Eine hundertprozentige Entfernung sämtlicher Zellbestandteile gilt jedoch als kaum realisierbar. In diesem Zusammenhang benannten Gilbert et al. in ihrer Übersichtsarbeit 2006 die vollständige Abtragung *sichtbaren* Zellmaterials als sinnvolles Kriterium für einen hybriden Scaffold mit guter Biokompatibilität. [63] Konkret wird zunächst oft die Zellmembran mittels physikalischer Maßnahmen in ionischen (salzhaltigen) Lösungen lysiert, ehe sich enzymatische Schritte, Detergenzien und weiteres Waschen zur Entfernung der zellulären Bestandteile und der potenziell schädlichen Reagenzien aus der EZM anschließen [45].

Physikalische Maßnahmen wie Schütteln, teilweise unter Zuhilfenahme von Ultraschall, oder Schockgefrieren zerstören Zellmembranen und erleichtern damit die anschließende Auswaschung von Zellbestandteilen. Für eine suffiziente Dezellularisierung sind diese Verfahren allein jedoch nicht ausreichend. Zudem liegen zu vielen physikalischen Maßnahmen kaum systematische Untersuchungen der idealen Applikationsintensität vor. Es ist also Vorsicht geboten, um nicht auch die Integrität der EZM durch zu stark einwirkende Kräfte zu beeinträchtigen. [63] Auch bei enzymatischen Verfahren wie der häufig eingesetzten Reaktion mit Trypsin scheint ein ausreichender Dezellularisierungserfolg kaum erreichbar zu sein, wenn man nicht längere Einwirkzeiten und damit einhergehende EZM-Schäden in Kauf nehmen möchte.

Einleitung

Trotz derartiger Probleme ist es aber unverzichtbar, Zellreste in der Matrix zu minimieren. Andernfalls drohen im Empfängerorganismus einer Tissue-engineerten Prothese klinisch relevante Komplikationen wie Kalzifizierung und potenziell schwere Immunreaktionen. [64]

Essenziell erscheint in Anbetracht der geschilderten Umstände die Ergänzung der zuvor genannten Methoden um chemische Verfahren, bei denen vor allem ionische und nicht-ionische Detergenzien von Interesse sind. Der ersten Gruppe zugehörig sind das häufig verwendete Natriumsalz der Dodecansäure (= Sodium dodecyl sulfate, SDS) sowie das Natriumsalz der Desoxycholsäure (= Sodium deoxycholate, SD). SDS beispielsweise wird ein äußerst effektives Lösen von Membranproteinen zugeschrieben, was jedoch fast immer mit einer gewissen Denaturierung des gesamten behandelten Materials einhergeht. [65] Klassischer Vertreter der als vergleichsweise schonend geltenden nicht-ionischen Detergenzien ist Alkylphenylpolyethylenglykol (*Triton*[®] X-100, TX). Es soll vor allem an Verbindungen mit Lipidanteil wirken, zeigte aber z. B. bei Grauss et al. durchaus auch degradierende Effekte auf EZM-Proteine wie Laminin oder Fibronectin. [66]

Unweigerlich verändern Verarbeitungsschritte, die in einem nennenswerten Ausmaß Zellen entfernen, auch die ursprüngliche dreidimensionale Gestalt der EZM. Für unterschiedliche Ausgangsmaterialien ist in diesem Zusammenhang zu beobachten, dass die ausgewogensten Ergebnisse mit Blick auf Zellentfernung und Matrixerhalt in der Regel bei umsichtiger Kombination verschiedener Dezellularisierungsstrategien erreicht werden. [67] Der individuelle Erfolg von Dezellularisierungsprotokollen scheint allerdings von vielen Variablen abzuhängen, die eine Etablierung universeller Protokolle bis zum heutigen Tag erschweren. Bekannte Einflussgrößen sind nicht zuletzt die Herkunft und Dicke des behandelten Gewebes, die Dichte der ursprünglichen Zell- bzw. EZM-Bedeckung und die genaue Kombination und Konzentration verwendeter Reagenzien, ggf. gepaart mit äußeren physikalischen Einflüssen. [68] Somit ist es für jeden zu entwickelnden Scaffold mit biologischer Komponente ratsam, frühzeitig Untersuchungen zu geeigneten Dezellularisierungsverfahren und deren sinnvoller Kombination durchzuführen.

4. Zielsetzung und Versuchsablauf

Für die vorliegende Arbeit wurde elektrogewebenes PU als vielversprechender Zellträger zugrunde gelegt. Verfolgt wurde ein biohybrider Ansatz, für den Werkstoffe mit humanen Fibroblasten (FB) besiedelt und nach EZM-Ausbildung wieder schonend von Zellen befreit werden sollten. Die Etablierung geeigneter Dezellularisierungsprotokolle stellte sich als zentrale Herausforderung zur Entwicklung biohybrider Scaffolds auf dieser Basis dar.

Die Hypothese zur Herstellung des Scaffolds fasst Abbildung 4-1 zusammen: PU wurde statisch mit FB besiedelt und über zehn Tage unter geeigneten Wachstumsbedingungen inkubiert. Durch die Stoffwechselaktivität der sich vermehrenden Zellen, die für jeden der fünf Besiedelungsdurchgänge einer eigenständigen und von den anderen Experimenten unabhängigen Population entnommen wurden, sollte eine konfluente EZM entstehen. Mittels schonender Dezellularisierungsmaßnahmen sollte die Entfernung des Zellmaterials erfolgen und eine möglichst unversehrte EZM als ideale Wachstumsgrundlage für anschließende Rezellularisierungs-Versuche *in vitro* zurückbleiben.

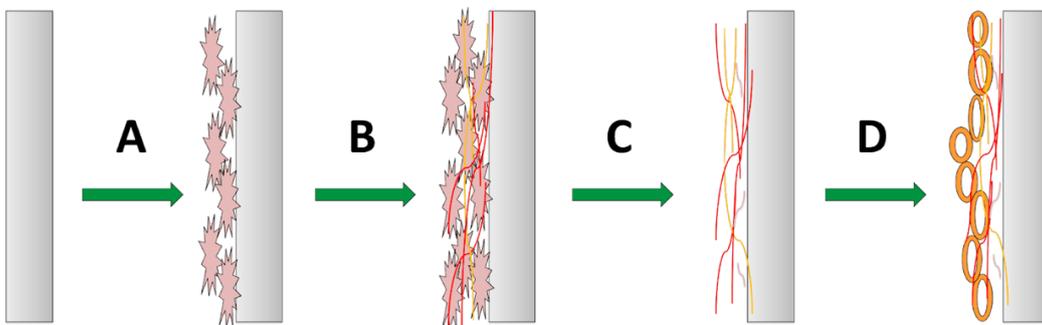


Abbildung 4-1 Hypothese zur Herstellung biohybrider Scaffolds auf Basis von PU (grauer Balken): Nach der statischen Besiedelung eines Patches mit FB (A) soll während der Inkubation über 10 Tage eine Vermehrung der ausgesäten Zellen erfolgen, die gleichzeitig zur Ausbildung einer EZM führt (B). Anschließend soll eine schonende Dezellularisierung erfolgen, die idealerweise nur die (möglichst unversehrte) EZM hinterlässt (C), ehe *In-vitro*-Experimente – wie z. B. eine dynamische Inkubation mit EC – die Eignung für eine zelluläre Re-Besiedelbarkeit überprüfen (D).

Angestrebt wurde die Schaffung optimaler Ausgangsbedingungen für die Re-Zellularisierung des biohybriden Scaffolds bei einem potenziellen *In-vivo*-Einsatz. Die gemäß Hypothese im Vergleich zu unbehandeltem PU höhere Attraktivität der Scaffolds für relevante Zellen wie EC sowie den Einfluss der zur Dezellularisierung verwendeten Detergenzien sollten zwei *In-vitro*-Versuche beleuchten.

Zielsetzung und Versuchsablauf

So erfolgte einerseits eine dynamische Inkubation der dezellularisierten Scaffolds mit EC aus humanen Venen in einem dreidimensional rotierenden Metallzylinder und andererseits ein direktes Aufnähen von venösen Gefäßen mit anschließender Inkubation ohne die bei der Zellgewinnung üblichen biologischen Vorbehandlungen. Ergänzend sollte auch die Haltbarkeit der erzeugten Scaffolds über einen längeren Zeitraum von 365 Tagen untersucht werden.

Mit der Gesamtheit der durchgeführten Versuche sollte letztlich die Frage beantwortet werden, inwieweit ein dezellularisierter biohybrider Scaffold auf PU-Basis einen attraktiven Ansatz für die klinische Anwendung von TE darstellt. Im Sinne der Fragestellung, die auf eine mögliche spätere Lagerhaltung der Scaffolds abzielt, wurden für die Rezellularisierungsversuche Zellen unterschiedlicher Populationen ohne Bezug zu den ursprünglichen Besiedelungen verwendet.

Eine vereinfachte Zusammenfassung der einzelnen Versuche im Zusammenhang mit der Herstellung und Evaluation des biohybriden Scaffolds auf PU-Basis zeigt in schematischer Form Abbildung 4-2:

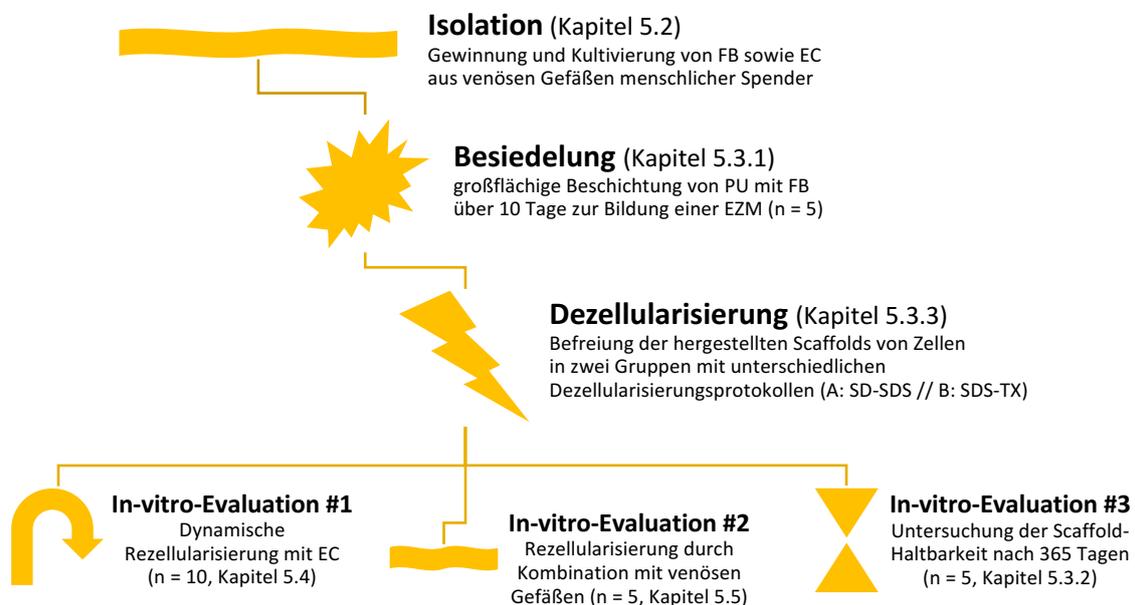


Abbildung 4-2 Vereinfachte schematische Zusammenfassung des gesamten Versuchsablaufs der Scaffold-Herstellung und -Untersuchung mit den Abschnitten Isolation, Besiedelung, Dezellularisierung und In-vitro-Evaluation

5. Material und Methoden

5.1 Elektrogenesponnenes Polyurethan

Für die durchgeführten Versuche wurde eine elektrogenesponnene aliphatische Variante des Kunststoffes PU verwendet, der seit Jahrzehnten erfolgreich in der medizinischen Praxis Anwendung findet. Das Material erfüllt nachweislich wichtige Kriterien wie Biokompatibilität und mechanische Belastbarkeit; zudem entwickelt es kaum relevante toxische oder thrombogene Effekte [69].

Mithilfe des vielseitigen und vergleichsweise wenig aufwändigen Elektrosinnings lassen sich aus synthetischen Polymeren kontinuierliche Fasern mit Durchmessern bis hinab auf die Nanometer-Ebene erzeugen. Hierfür wird eine Polymerlösung geeigneter Viskosität in Gegenwart eines elektrostatisch geladenen Feldes aus einer Spinnöse ausgestoßen. Dabei gehen die Flüssigkeitstropfen in einen Strahl über, der sich streckt und dabei rasch zu einer feinen Faser verfestigt. Diese wird mithilfe eines Kollektors aufgefangen. [70] Die Methode gestattet dem Anwender ein hohes Maß an Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Materials: Die Orientierung der Fasern, ihr Durchmesser sowie die Porengröße und Oberflächenbeschaffenheit können gesteuert werden, was Elastizität und Zugfestigkeit zugutekommt. [71]

Mithilfe eben dieser Elektrosinnings-Technik wurden PU-Patches vom *Institut für Textil- und Verfahrenstechnik* (ITV, Denkendorf, D) in mehreren Chargen jeweils mit einer Dicke von 0,12 mm erzeugt und sterilisiert bereitgestellt [72]. Die PU-Bögen des ITV wurden nach Abtrennung von Segmenten passender Größe mittels Skalpell (Sicherheitsskalpell Nr. 20, Aesculap AG, Tuttlingen, D) bis zur weiteren Verwendung in dampfsterilisierten PPCO-1000-ml-Weithalsbechern mit Verschluss (Nalgene, Rochester, NY, USA) aufbewahrt, die mit thermoplastischer Folie (Parafilm „M“, Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) versiegelt wurden.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Verwendung humaner Venengrafts und Rahmenbedingungen

Für die verschiedenen Phasen der Versuche war die Kultivierung humaner FB und EC nötig. Ausgangsmaterial für die Gewinnung beider Zellarten waren humane Venengrafts. Zu deren Sammlung wurden am Rande von Bypass-Operationen in der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) verbliebene Segmente der jeweils präparierten Vena saphena magna zurückbehalten. Dies erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission (Aktenzeichen 259-15), die die Unbedenklichkeit dieses Vorgehens festgestellt hatte, jeweils nach schriftlicher Einwilligung der gesondert aufgeklärten Patienten (vgl. Anhang). Das Material war bei der Übernahme aus dem OP irreversibel anonymisiert, ohne dass eine systematische Erhebung und Übermittlung spenderbezogener Informationen erfolgte. Die Gefäßsegmente wurden einer Lagerung bei 4 ° C zugeführt. Als Nährlösung diente Medium (M) 199 (Biochrom GmbH, Berlin, D) samt 1 % gebrauchsfertiger Penicillin-Streptomycin-Lösung mit 5000 I.E./ml Penicillin und 5 mg/ml Streptomycin (PenStrep, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Verarbeitet wurden nur makroskopisch unbeschädigte, dichte Gefäße mit ausreichender Länge (> 3 cm) und einer Lagerungsdauer unter sieben Tagen.

Alle Arbeitsschritte mit Verarbeitung von humanem Material, Zellkulturen und damit in Kontakt kommenden Reagenzien wurden unter sterilen Bedingungen an der „Laminar Airflow“-Sicherheitswerkbank „Herasafe“ (Heraeus Holding GmbH, Hanau, D) durchgeführt. Die gemäß Herstellervorgaben gelagerten und gekühlten bzw. tiefgefrorenen Reagenzien wurden vor Verwendung im Wasserbad SW23 (Julabo GmbH, Seelbach, D) auf 37 ° C erwärmt. Für die anschließende Inkubation dienten Brutschränke (CB210, Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, D und Heracell, Heraeus Holding GmbH) mit einheitlich 37 ° C Innentemperatur und 5 % CO₂-Begasung. Die hälftige Erneuerung der verwendeten Zellkulturmedien erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei allen Versuchen jeweils zwei- bis dreitäglich.

5.2.2 Isolierung von Endothelzellen aus Venengrafts

Postoperativ aufbewahrte Venensegmente wurden aus den zur Lagerung dienenden 50-ml-PP-Schraubrohren (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D) entnommen und entsprechend der von den Venenklappen vorgegebenen Flussrichtung einseitig

Material und Methoden

mit Gefäßkanülen (Medtronic GmbH, Meerbusch, D) kanüliert. Das kanülierte Ende wurde mithilfe eines chirurgischen Fadens (DSM 24 + Supolene 3-0 grün 0,75 m, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, D) und einer Bulldog-Klemme gegen Dislokation gesichert. Zur Beseitigung von Blutrückständen und Zelldetritus wurde mittels Dreiwegehahn (Discofix C-3, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) unter alternierendem Abklemmen und Freigeben des Ausstroms pulsierend ein Spülmedium durch die Vene geleitet. Dieses setzte sich zusammen aus dem Grundmedium M199 mit 10 I. E. / ml Heparin (Heparin-Natrium 25.000 I. E. / 5 ml, B. Braun Melsungen AG) und 0,1 mg / ml Gentamicin (Gentamicin 50 mg / mL, Gibco®, Life Technologies Inc, Grand Island NY, USA).

Eine via Spritzenfilter (Millex-GS 0,22 µm, Millipore GmbH, Schwalbach, D) steril filtrierte Kollagenase-Lösung wurde bis zum Austreten ungetrübter Tropfen der Lösung durch das Gefäß gespült. Die Lösung wurde taggleich hergestellt aus 7 mg Kollagenase Typ 2 (CLS-2 mit 300 U / mg, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) und 10 ml Humanem Serum Albumin 1 % (in PBS der Biochrom GmbH, verdünntes Human Albumin 20 % der Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D). Nach erneutem Abklemmen wurde das Gefäß vollständig mit Kollagenase-Lösung gefüllt, sicher verschlossen und in einem vorerwärmten, PBS-gefüllten Weithalsbecher für 15 min im Brutschrank gelagert. Es folgte das pulsierende Ausspülen der Zellfraktion in eine 50-ml-Röhre mittels Einleitung einer „Stopplösung“ aus M199 mit 20 % FCS (= Fetal Bovine Serum der Biochrom GmbH, nach Hitzeinaktivierung sowie Filtrierung durch 0,2-µm-PES-Filter).

Nach Zentrifugation (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D) über 5 min mit einer Beschleunigung von 500 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4,5 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) resuspendiert (= Basalmedium der Promocell GmbH, Heidelberg, D, mit spezifischem SupplementMix, 5 % FCS sowie 0,2 % PenStrep). Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche mit 12,5 cm² Wachstumsfläche (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) überführt und bis zur Konfluenz inkubiert.

Durch Wiederholung der Schritte ab Einbringen der Kollagenase-Lösung wurde aus jeder Vene analog eine zweite EC-Fraktion gewonnen.

5.2.3 Isolierung von Fibroblasten aus Venengrafts

Ein Venensegment von etwa 1 cm Länge, das vor der EC-Isolierung abgetrennt und weiter in Nährmedium aufbewahrt wurde, diente der Gewinnung von FB-Kulturen. Hierfür wurden nach Längseröffnung des Segments zügig Stücke mit 1 x 1 mm Fläche zugeschnitten und auf dem Boden einer sterilen Petrischale aus Polystyren (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D) mit 10 cm Durchmesser verteilt. Die Anordnung erfolgte in Form zweier Quadrate. Anschließend wurden die so arrangierten Gefäßsegmente mit sterilisierten Deckgläsern (24 x 24 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) bedeckt, deren Position mit sterilisierter hochviskoser Silikonpaste (Báysilone, GE Bayer Silicones GmbH & Co. KG, Leverkusen, D) fixiert wurde. Es folgte die Zugabe von 12 ml Fibroblast Growth Medium (FGM, entspricht Basalmedium der Promocell GmbH, mit spezifischem SupplementMix, 10 % FCS sowie 0,2 % PenStrep). Während der anschließenden Inkubation der verschlossenen Petrischale wurde das bis zur ersten Erneuerung einwöchig belassene Wachstumsmedium - wie im weiteren Verlauf üblich - zwei- bis dreitäglich partiell gewechselt.

5.2.4 Trypsinieren konfluenter Zellkulturflaschen

Adhärente Zellen wurden bei Konfluenz einer Kulturflasche, also dem gleichmäßigen Bewuchs von 90 bis 100 % der Grundfläche, mithilfe einer von Trypsin enzymatisch ausgelösten Reaktion in die nächste Passage überführt. Vorausgesetzt wurde jeweils das phasenkontrastmikroskopische Bild (Axiovert 35, Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D) vitaler Zellen ohne Zeichen einer Mischkultur und ohne Hinweise auf bakterielle Verunreinigung.

Die in den Petrischalen der FB-Isolierung ausgewachsenen Zellen wurden zunächst in T25-Zellkulturflaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche (Becton Dickinson GmbH) transferiert. Hierzu erfolgte die Benetzung mit PBS für 2 min bei Raumtemperatur (RT) unter vorsichtiger Abnahme von FGM und Deckgläsern. Nach Verwerfen des Überstands wurde gleichmäßig eine Trypsin-Lösung auf die bewachsene Fläche aufgebracht (1:20 in PBS verdünnte Trypsin-EDTA-Lösung 10x der Sigma Aldrich Chemie GmbH). Die enzymatische Ablösung der adhärenen FB wurde durch Lagerung im Inkubator über 5 min katalysiert. Anschließendes Klopfen gegen die Kulturflasche gewährleistete die mikroskopisch kontrollierte, möglichst

Material und Methoden

vollständige Ablösung aller Zellen. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Vereinigung mit einem Gemisch aus M199 (inkl. 0,2 % PenStrep) und 20 % hitzeinaktiviertem FCS in einer 50-ml-Röhre gestoppt. Es folgte die Zentrifugation mit einer Beschleunigung von 500 g für 5 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in FGM aufgenommen und als „P1“ im nächstgrößeren Kulturgefäß mit entsprechendem Wachstumsmedium weiter inkubiert.

Die Trypsinierung der nach ihrer Isolierung zunächst in T12,5-Flaschen kultivierten EC und die Überführung von Zelllinien zwischen unterschiedlichen Kulturflaschen erfolgte analog. Für EC kamen abweichend eine verkürzte Trypsin-Einwirkzeit von 3 min sowie ECGM (statt FGM) für die weitere Inkubation zum Einsatz.

Einzelheiten zu den verwendeten Volumina und Gefäßen bei den genannten Arbeitsschritten mit Zellkulturen sind der nachfolgenden Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 Volumina beim Passagieren von Zellen abhängig vom Kulturgefäß

	Petrischale (Ø 10 cm)	T12,5-Flasche	T25-Flasche	T175-Flasche (max. drei)
PBS	14 ml	6 ml	8 ml	je 14 ml
Trypsin	5 ml	1,5 ml	2 ml	je 5 ml
Stopplösung M199 / FCS	9 ml / 5 ml	7 ml / 2 ml	7 ml / 2ml	insgesamt 9 ml / 5 ml
Zielbehältnis	1x T25	1x T175	2x T175	2 - 3x T175
Wachstumsmedium je Zielflasche (primäre Resuspension)	7 ml	4,5 ml	2 ml	2 ml
Gesamtvolumen je Zielflasche (mit FGM / ECGM aufgefüllt)	7 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Besonderes Augenmerk galt bei der Trypsinierung von Kulturflaschen dem gründlichen Abspülen aller Innenflächen nach dem Ende der Enzym-Einwirkung. Dies sollte den Verlust von Zellen vermeiden, die beim Klopfen gegen die Kulturflaschen zuvor mobilisiert worden waren.

5.2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Um trotz schwankender Verfügbarkeit von Quellmaterial für die Zellisolierung eine ausreichende Flexibilität für die weiteren Versuche zu gewährleisten, wurden erfolgreich kultivierte Zellreihen nach Bedarf kryokonserviert.

Zum Einfrieren wurde bei konfluenten T175-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co.) mit einer zu erwartenden Zahl von ca. 3×10^6 enthaltenen Zellen zunächst analog dem Kapitel 5.2.4 vorgegangen. Nach Abschluss des Zentrifugierens und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet unter gründlichem Resuspendieren in einem Gemisch aus 70 % FGM bzw. ECGM, 20 % hitzeinaktiviertem FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (= DMSO, Sigma Aldrich Chemie GmbH) aufgenommen. Das Gesamtvolumen und die Zahl der zu befüllenden 1,8-ml-Cryovials aus Polyethylen (Nunc GmbH & Co. KG) wurden so gewählt, dass sich etwa 1×10^6 Zellen und ein Füllstand von 1,5 ml pro einzufrierendem Vial ergaben. DMSO diente als abschließend hinzugegebenes Gefrierschutzmittel, um die Bildung schädlicher Eiskristalle zu vermeiden [73]. Die Verteilung und Einlagerung bei -80°C (Ultratiefkühlschrank HERAFreeze, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D) erfolgte ohne jede Verzögerung, um Schäden durch die schon für niedrigere Konzentrationen nachgewiesene Zytotoxizität von DMSO bei RT zu minimieren [74]. Im Verlauf erfolgte binnen einer Woche die Umlagerung in Flüssigstickstoff, sofern eine längerfristige Aufbewahrung nötig wurde.

Beim Wiederauftauen wurden entsprechend drei Vials derselben Zelllinie und Passage bei 37°C schonend angewärmt. Der Inhalt wurde dann in einem Auftaumedium aus M199 (inkl. 0,2 % PenStrep) mit 20 % inaktiviertem FCS gelöst und in eine 50-ml-Röhre überführt. Wie beim Einfrieren wurde rasch gearbeitet, um mögliche Schäden durch DMSO-Einwirkung gering zu halten. Die Suspension wurde für 5 min bei einer Beschleunigung von 500 g zentrifugiert. Das nach Verwerfen des Überstands verbliebene Zellpellet wurde in 2 ml des zellspezifischen Wachstumsmediums aufgenommen und in eine 175-cm²-Kulturflasche überführt, die mit Medium ad 30 ml aufgefüllt wurde (Zielmenge 1×10^6 Zellen / Flasche; vgl. Tabelle 1). Es folgten die Inkubation und Weiterverarbeitung unter den bekannten Rahmenbedingungen.

5.2.6 Manuelle bzw. halbautomatische Zellquantifizierung

Der Einsatz von Neubauer-Zählkammern ermöglichte die Festlegung, welche Volumina der Zellsuspension nach der enzymatischen Zellablösung (vgl. 5.2.4) weiterverarbeitet werden sollten. Hierfür wurde in einem Reaktionsgefäß eine geringe Menge der gründlich durchmischten Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung 0,4 % (Sigma Aldrich Chemie GmbH) vereint. Dabei wurde eine abhängig von der erwarteten Zellzahl festgelegte Verdünnung vorgenommen, in der Regel mit einem Teil der Zellsuspension und fünf Teilen Trypanblau (= Verdünnungsfaktor 6). Vom resuspendierten Resultat dienten 10 µl als Basis für die Quantifizierung in der Einweg-Zählkammer (Neubauer Improved C-Chip, Digital Bio Technology Co., Ltd., Suwon, Südkorea). Durch die Anfärbung toter Zellen und die ausbleibende Anfärbung lebendiger Zellen konnte während der Betrachtung gleichzeitig die Vitalität der jeweiligen Zellkultur validiert werden. Mit derselben Methode erfolgte daher eine Quantifizierung letaler Zellen im Medium zur Restzellzahlbestimmung nach Beschichtungsversuchen.

Über die Auszählung von vier großen Quadranten der Zählkammer, die unter dem Phasenkontrastmikroskop durchgeführt wurde, ergab sich mithilfe von Formel 1 abhängig vom Mittelwert die rechnerisch zu erwartende Zellzahl in der gesamten Ausgangssuspension. Die für einen Versuch weiter zu verarbeitenden Volumina wurden davon ausgehend in Abhängigkeit der Zielzellzahl errechnet.

Formel 1: Berechnung der Zellzahl in einer Suspension mithilfe der vier Quadranten einer Zählkammer:

$$Z = \frac{\sum_{i=1}^4 Z_i}{4} \times c_{\text{Zellsuspension}} \times V_{\text{Zellsuspension}} [\text{ml}] \times \frac{10.000}{\text{ml}}$$

Eine halbautomatische Zellquantifizierung an den fluoreszenzmikroskopischen Bildaufnahmen nach dynamischer Rezellularisierung der entwickelten biohybriden Scaffolds mit EC wurde mithilfe der Software „ImageJ“ (Wayne Rasband, NIH) vorgenommen. Die genaue Methodik ist in Kapitel 5.8 bei der Beschreibung der Fluoreszenzmikroskopie dargelegt.

5.3 Herstellung zellfreier biohybrider Scaffolds

Die Primärbesiedelung des nativen PU erfolgte mit $7,5 \times 10^5$ FB/cm². Eine ausreichende chemotaktische Aktivität selbst bei Zellen von Spendern in höherem Lebensalter wurde bis einschließlich Passage 8 der Zellkulturen angenommen [75].

5.3.1 Statische FB-Besiedelung zur Generierung einer EZM auf PU

Um eine Grundlage für biohybride Scaffolds zu erzeugen, wurden in der Vorbereitung dieser Arbeit FB in einem rotierenden Metallzylinder über 24 h mit aufgespannten PU-Patches inkubiert (n = 3) und die Ansätze anschließend über zehn Tage kultiviert. Die darauffolgenden REM-Analysen ergaben allerdings, dass eine ausreichend homogene und reproduzierbare EZM-Entwicklung mit diesem Verfahren nicht gewährleistet werden konnte (siehe Anhang, Abbildung 10-1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde stattdessen eine statische Besiedelungsmethode zur EZM-Beschichtung großflächiger PU-Patches als Grundlage für die geplanten Scaffolds entwickelt. Zur Erzeugung ausreichender Materialmengen und Sicherstellung eines reproduzierbaren Beschichtungserfolgs wurde n = 5 gewählt.

Auf dem Innenboden eines dampfsterilisierten 1000-ml-PP-Weithalsbechers mit 112 mm Durchmesser wurde steril ein auf 130 mm Durchmesser zugeschnittener PU-Patch platziert. Der aus den abweichenden Durchmessern resultierende Überstand wurde am Innenrand des Behälters hinaufgefaltet. So wurde verhindert, dass sich der Patch vom Boden lösen und Zellen der später hinzugegebenen Suspension unter das zu besiedelnde PU gelangen konnten. Den Patch nach der späteren Entfernung aus dem Weithalsbecher zeigt Abbildung 5-1.

Nach Befüllen des Bechers mit 400 ml FGM inkl. 1 % PenStrep wurde diejenige Menge Zellsuspension zugegeben, die nach Ablösung aus den Kulturflaschen (vgl. 5.2.4) gemäß Zellzählung (vgl. 5.2.6) rechnerisch $7,2 \times 10^7$ FB enthielt. Das Hinzufügen der Zellsuspension erfolgte mittels serologischer Pipetten (Costar, Corning INC, Corning, NY, USA) ins untere Drittel des Bechers unter Verwendung einer Pipettierhilfe (Pipetboy acu, Integra Biosciences GmbH, Biebertal, D). Mit einer kontinuierlichen spiralförmigen Bewegung vom Zentrum zum Rand des Patches sowie einem vorsichtigen Schwenken sollte die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem PU begünstigt werden.



Abbildung 5-1 Aus dem Inkubationsgefäß entnommenes PU (Ø 130 mm) nach statischer FB-Besiedelung über 10 Tage (mit emporringendem Randsegment).

Auf dem Verschlussdeckel des Ansatzes wurden mithilfe von Adapterstücken eines Druckausgleichsets (VWR International GmbH, Darmstadt, D) Dreiwegehähne mit sterilen Spritzenfiltern (0,22 µm) angebracht, um im Brutschrank einen Gasaustausch unter sterilen Bedingungen zu ermöglichen. Partielle Wechsel des Nährmediums erfolgten während der zehn Tage andauernden Inkubation unter Brutschrankbedingungen nach drei Tagen (100 ml) bzw. nach sechs Tagen (200 ml).

5.3.2 Weiterverarbeitung, Proben und Langzeitlagerung

Nach Abschluss der zehntägigen Inkubation wurden zur Untersuchung auf in Lösung verbliebene Zellen je 50 ml des Nährmediums bei 500 g zentrifugiert und einer Zellzählung zugeführt (vgl. 5.2.6). Der besiedelte PU-Patch wurde unter der Sterilbank mit einem Skalpell in 4 x 1,5 cm messende Streifen aufgeteilt, die teils für eine Analyse fixiert, teils den unterschiedlichen Dezellarisierungsprotokollen zugeführt wurden (vgl. 5.3.3). Ein nicht maßstabsgetreues Schema zur Aufteilung des besiedelten PU und der weiteren Verwendung der jeweiligen Segmente zeigt Abbildung 5-2. Wie dargestellt wurden für Immunhistochemie (IHC) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) separate Proben aus der Mitte und vom Rand der Ansätze gewonnen. Die Probenverarbeitung erfolgte mit größtmöglicher Vorsicht, um mechanische Schäden und Artefakte bei der Auswertung zu minimieren. Unter sterilen Bedingungen und stetiger Anfeuchtung mit PBS erfolgte mithilfe eines Skalpells der Zuschnitt ausreichend großer rechteckiger Probenstücke mit einer Breite von mindestens 5 mm.

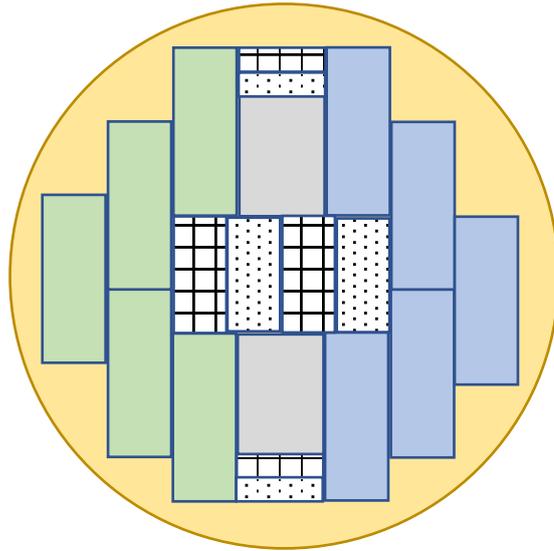


Abbildung 5-2 Schema zur Aufteilung des statisch FB-besiedelten PU (gelb), nicht maßstabgetreu. Jeweils fünf Patch-Streifen wurden mit den Maßen 4 x 1,5 cm angefertigt für die anschließende Dezellularisierung mit SD / SDS (grün) bzw. SDS / TX (blau). Ausreichend große Abschnitte aus der Mitte und vom Rand des besiedelten PU-Kreises wurden für die immunhistochemische Analyse (kariert) bzw. die REM-Analyse (gepunktet) in entsprechende Fixierlösungen überführt. Restsegmente wurden vorübergehend als Reservematerial bei - 80 ° C eingefroren (grau).

Die Proben wurden für die IHC für 72 h in gebrauchsfertiger 4 %-iger Formalin-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) bei 4 ° C gelagert. Zur Fixierung für die REM erfolgte bei ebenfalls 4 ° C für 48 h die Lagerung in so genannter „FIX II“-Lösung. Diese wurde aus Na-CaCO (11,3 g - Sigma Aldrich Chemie GmbH) + Aqua bidest (912,0 ml) + HCl 1 N (1,5 ml - Merck KGaA, Darmstadt, D) + Glutaraldehyd 25 % (86,0 ml - Sigma Aldrich Chemie GmbH) hergestellt, sodass eine Lösung mit 2 % Glutaraldehyd resultierte.

Bei der Entwicklung von Scaffolds für den therapeutischen Einsatz „off-the-shelf“ ist die Haltbarkeit von zentraler Bedeutung. Deshalb wurde nach Abschluss der Dezellularisierung der Erhalt der EZM nach längerfristiger Lagerung überprüft. Hierfür erfolgte die Konservierung von dezellularisierten Scaffold-Fragmenten in PBS + 0,2 % PenStrep bei 4 ° C über 365 Tage mit anschließender erneuter Abtrennung und Fixierung von Segmenten für REM- und IHC-Proben.

Grundsätzlich wurde während der Verarbeitung der Scaffoldmaterialien in jedem durchgeführten Versuch stets eine kontinuierliche feuchte Lagerung in Nährmedium sichergestellt, um keine Materialschäden durch Austrocknung bzw. mangelhafte Nährstoffversorgung von Zellen auf dem Probenmaterial zu riskieren.

5.3.3 Dezellularisierungsprotokolle

Die Auswahl zu untersuchender Dezellularisierungslösungen für eine bestmögliche Entfernung der ausgesäten FB von den PU-Patches erfolgte auf Basis von Literatur (vgl. 3.7) und laborinternen Voruntersuchungen zu den Detergenzien SD, SDS und TX. Es folgte die Festlegung der in Tabelle 2 dargestellten Dezellularisierungsprotokolle, mit Lösung aller genannten Substanzen in PBS.

Tabelle 2 Vergleichene Dezellularisierungsprotokolle (alle Substanzen gelöst in PBS)

	Gruppe A: „SD / SDS“	Gruppe B: „SDS / TX“
Detergenzien + Einwirkzeit	0,5 % SD + 0,5 % SDS (16 h)	0,5 % SDS (16 h) ↓ 0,5 % TX (0,5 h)
Waschung	0,2 % PenStrep (24 h) 6x	

Die Herstellung der Reagenzien erfolgte im Fall von SD und SDS durch Lösung entsprechender Mengen der mittels Analysewaage (KERN & Sohn GmbH, Balingen, D) gewogenen Feststoffe in PBS und anschließend gründliche Durchmischung auf einem Wipptisch (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, D) über > 15 min. Das zähflüssige TX wurde bei Raumtemperatur nach gründlicher Durchmischung langsam aufgezogen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu minimieren, und in PBS gelöst. Die Dezellularisierungslösungen wurden steril filtriert (0,2 µm-PES-Membran-Filter von Nalgene) und bis zu ihrem Einsatz bei 4 ° C gekühlt verwahrt.

Für den Vorgang der Dezellularisierung wurden von jedem Durchgang der FB-Inkubation je zehn der gemäß 5.3.2 gewonnenen streifenförmigen PU-Patches verwendet (fünf pro Dezellularisierungsgruppe). Diese wurden in dampfsterilisierte 1000-ml-PP-Weithalsbecher überführt, in denen 250 ml der jeweiligen Dezellularisierungslösung vorgelegt wurden. Zur gleichmäßigen Befeuchtung der Patches und zur mechanischen Unterstützung des Prozesses wurde der Probenbecher bei RT auf dem Wipptisch mit 5 ½ cycles/min bzw. in einem Schüttelinkubator (KS 15 B, Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, D) mit 125 rpm fixiert. Es folgte die sterile Überführung in neue PP-Behälter zur Durchführung von sechs Waschzyklen über je 24 h. Als Waschlösung wurden 250 ml PBS mit 0,2 % PenStrep verwendet und nach jedem Zyklus gewechselt.

Nach Abschluss der Waschungen wurden Proben zur Analyse gewonnen (vgl. 5.3.2) und bis zur Weiterverarbeitung für jeden Patch 20 ml PBS-PenStrep-Lösung zur Einlagerung in 50-ml-PP-Röhren bei 4 °C vorgelegt.

5.4 Dynamische Rezellularisierung mit Endothelzellen

Für die dynamische Inkubation der erzeugten Scaffolds mit EC im Beschichtungs-Zylinder (n = 10) wurde abweichend von der FB-Besiedlungsdichte eine geringere Zellzahl von 150.000 Zellen / cm² festgelegt. Die hierdurch erwartete niedrigere Dichte der auf dem Scaffold angewachsenen Zellschicht sollte eine Zählbarkeit der Zellen mit halbautomatisierten Methoden in der späteren Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen. Ermittelt wurde die gewählte Zellzahl im Rahmen einer Verdünnungsreihe (n = 5) mit EC auf gesondert dezellularisiertem, EZM-bedecktem PU. Diese Verdünnungsreihe war als Vorversuch durchgeführt worden (vgl. Anhang). Vor der Weiterverarbeitung wurden alle Scaffolds eindeutig markiert, z. B. durch Zuschnitt oder Knotenmarkierung mit chirurgischem Faden. So konnten bei der Auswertung die Vorder- und Rückseiten weiterhin unterschieden werden und in Form der nicht beschichteten PU-Seite lag gleichzeitig eine Nativprobe vor.

Für die dynamische Rezellularisierung mit EC wurde eine zylinderförmige Teflon-Halterung aus vier 42-mm-Stäben und je einem Halterungsring oben und unten verwendet. An diesen Ringen wurden vier Scaffolds pro Durchgang des Versuchsansatzes jeweils so befestigt, dass sie wie Segel in der Teflon-Halterung aufgespannt waren (Abbildung 5-3 A). Die Scaffolds wurden an Ober- und Unterkanten mit chirurgischem Faden (Prolene 5-0 bzw. Excel 4-0, Ethicon, Somerville, NJ, USA) an die gelöcherten Halterungsringe angenäht.

Auf konsequente Befeuchtung der Scaffolds wurde ebenso geachtet wie auf möglichst atraumatisches Vorgehen und eine nur leichte Spannung bei der Befestigung. Der Zylinder mit den Patches wurde nach Trypsinieren und Zählung der EC mit dem benötigten Volumen der Zellsuspension in einen Metallzylinder überführt. Dieser wurde mit ECGM aufgefüllt, fest verschlossen, gründlich geschwenkt und mittels ECGM-Injektion über einen Dreiwegehahn von verbliebener Luft befreit. Nach dem Schließen des Dreiwegehahns erfolgte die Befestigung in einer Rotationshalterung.

In dem so entstandenen Bioreaktor (Abbildung 5-3 B) wurden die zugegebenen EC über 24 h mit den PU-Patches inkubiert. Ein Zyklus mit 2,5 min dreidimensionalem Drehen und 30 min Stillstand wurde festgelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Scaffoldflächen zu ermöglichen.

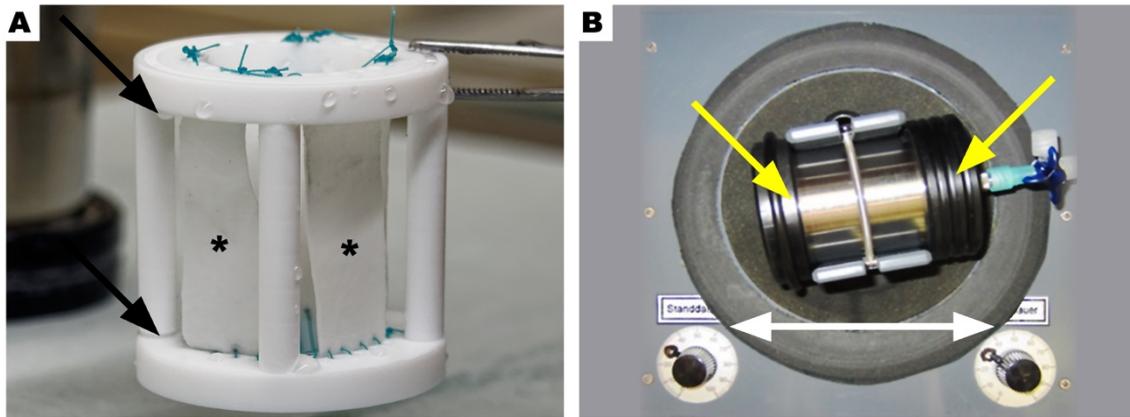


Abbildung 5-3 Versuchsaufbau zur dynamischen Rezellularisierung der erzeugten biohybriden Scaffolds mit EC im Sinne eines 3D-Beschichtungsbioreaktors. A: Ein aus vier Stäben und zwei Halteringen zusammengesteckter Teflonzylinder (schwarze Pfeile) hielt insgesamt vier eingenähte Scaffolds (*). B: Der in A abgebildete Aufbau wurde mit Zellsuspension in einen Metallzylinder (gelbe Pfeile) überführt, der anschließend auf einer Rotationsvorrichtung (weißer Doppelpfeil) unter kontrollierten Bedingungen dreidimensional bewegt wurde.

Nach Ablauf der 24 h wurde der Bioreaktor gestoppt und der Metallzylinder unter der Sterilbank geöffnet. Die von Nahtlöchern betroffenen Randbereiche der Scaffolds wurden abgetrennt und verworfen. Ein Teil des Mediums wurde unmittelbar mittels Vital-Letal-Färbung (vgl. 5.8) untersucht. Weiterhin erfolgte die Fixierung von Proben für IHC und REM mit Markierung der Vorder- und Rückseiten.

5.5 Rezellularisierung durch Aufnähen von Venengrafts

Eine Machbarkeitsstudie ($n = 3$) mit nativem PU in drei verschiedenen Kulturmedien hatte in der Vorbereitung dieser Arbeit orientierend gezeigt, dass FB vom Lumen eröffneter Arterien-Segmente auf das Material auswachsen können. EC-Medium hatte dabei als universelle Wachstumsgrundlage überzeugt.

Für einen Rezellularisierungsversuch ausgehend von aufgenähten Venengrafts ($n = 5$) als zweiter Teiluntersuchung der biohybriden Scaffolds fiel abweichend von der genannten Voruntersuchung die Wahl auf universeller verfügbare Venenfragmente. Die Vitalität der Zellen dieser Gefäße, die maximal 7 Tage nach der operativen Entnahme verarbeitet wurden, wurde mithilfe eines Vital-Letal-Assays

Material und Methoden

(vgl. 5.8) fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Im Anschluss wurden Stücke der untersuchten Vene mit je einem Scaffold der Gruppen A und B zusammengenäht ($n = 5$). Diese beiden Scaffolds entstammten jeweils derselben ursprünglichen FB-Beschichtung, sodass gleiche Ausgangsbedingungen hinsichtlich der EZM-Beschaffenheit innerhalb eines Versuchsdurchgangs anzunehmen waren.

Die längs eröffneten Gefäßsegmente wurden nach Schlitzung des Scaffolds jeweils so durch diesen hindurchgeführt, dass das Lumen auf der EZM-Seite zum Liegen kam. Der so präparierte Ansatz wurde durch eine distale Knopfnahat zwischen Gefäß und Scaffold möglichst weit abseits der Schlitzung fixiert und von zwei Teflonringen diagonal beschwert (Abbildung 5-4). So erfolgte die Inkubation mit 6 ml ECGM in einer Petrischale über 21 Tage mit partiellen Mediumwechseln jeweils 5, 10, 12, 14 und 19 Tage nach Versuchsbeginn.

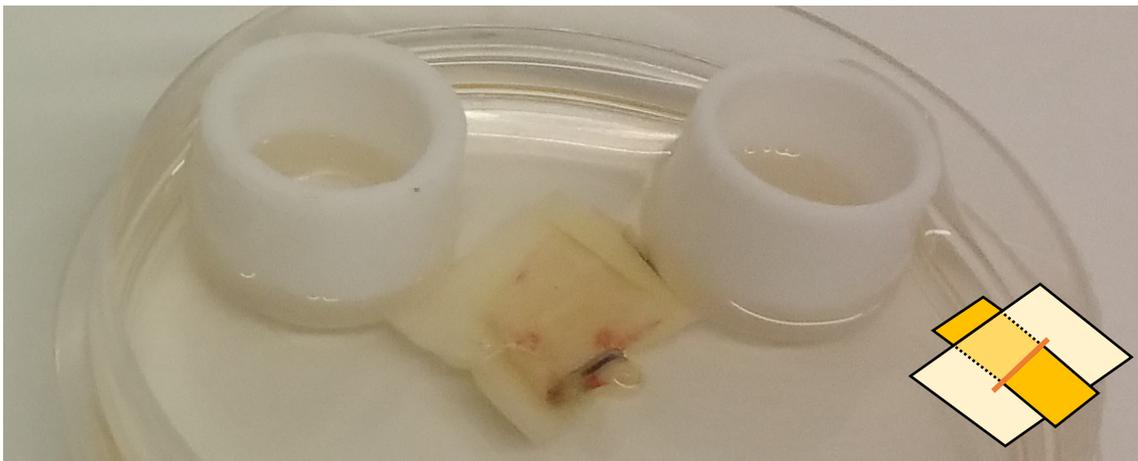


Abbildung 5-4 Aufbau des 21-tägigen Auswachsversuchs (rechts unten schematisch vereinfacht): Zu sehen ist ein längs eröffnetes Venensegment (im Schema orange), das mit der Lumenseite nach unten durch einen geschlitzten EZM-haltigen Scaffold (im Schema hellgelb) hindurchgeführt wurde. Von Teflonringen beschwert (im Schema nicht dargestellt) befand sich der Ansatz in einer Petrischale mit ECGM.

Abschließend erfolgte die hälftige Probenfixierung für IHC und REM, wobei das Gefäßsegment zur Mitbetrachtung im REM belassen wurde. Reproduzierbar stabile Paraffinschnitte für die IHC-Untersuchung gelangen nur unter der Voraussetzung, dass das Gefäß vor der Einbettung entfernt wurde. Da die Schnittebenen somit nicht mehr in Relation zur Position des Gefäßes während der Inkubationszeit gesetzt werden konnten, erfolgte behelfsweise die Anfertigung von Paraffinschnitten aus drei gleichmäßig über die Probe verteilten Abschnitten, um mögliche Unterschiede dennoch zu erfassen.

5.6 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Bildaufnahme im Rasterelektronenmikroskop EVO LS 10 (Zeiss MicroImaging GmbH) mit der Software „SmartSEM“ war eine Vorbereitung der Proben mittels Kritisch-Punkt-Trocknung und Sputterdeposition notwendig. Alle Proben wurden mittig sowie in Randbereichen untersucht und Vorder-/ Rückseiten jeweils getrennt und in mehreren Vergrößerungen betrachtet.

Für aussagekräftige Untersuchungsergebnisse in der REM mussten Beschädigungen wie Risse oder Löcher vermieden werden, die bei einer unkontrollierten Trocknung biologischer Proben durch die Verdunstung enthaltener Flüssigkeiten entstünden. Solche Prozesse wären spätestens im Vakuum des REM unvermeidbar. Hier kam die Kritisch-Punkt-Trocknung zum Einsatz: Sie macht sich den sog. Kritischen Punkt zunutze, an dem sich die Dichte von gasförmiger und flüssiger Phase eines Stoffes angleichen. Damit kann der problematische Phasenübergang vermieden werden. Aufgrund des für die Probenverarbeitung ungeeigneten Kritischen Punkts von Wasser (kritischer Druck 228,5 bar, kritische Temperatur 374°C) erfolgte die Trocknung der Proben mithilfe von CO₂ (73,8 bar, 31° C). [76] Im Anschluss erfolgte eine Goldbeschichtung, um eine leitende Oberfläche für die Untersuchung durch den Elektronenstrahl des REM zu erzeugen. Die zeilenweise erfolgende Abrasterung der so behandelten Probenoberfläche im REM ermöglichte schließlich die computergestützte Erzeugung eines sichtbaren Bildsignals.

5.6.1 Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung

Zur schonenden Trocknung wurden die in FIX-II-Lösung eingelagerten Proben im Probenkarussell des Kritisch-Punkt-Trockners zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Ethanol (EtOH) unter jeweils zehnmütiger Einwirkzeit bei RT entwässert (EtOH 30 %, 50 %, 70 %, 96 %). Anschließend wurden die Proben in auf - 20 ° C vorgekühltes unvergälltes EtOH absolut überführt. Es folgte die Kritisch-Punkt-Trocknung im CPD 030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein), bei der das EtOH der entwässerten Proben bei einer Temperatur von 8 ° C und Überdruck zunächst über zehn Zyklen hinweg gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht wurde. Dem Einlass des Austauschmediums folgte jeweils eine mindestens einminütige Einwirkzeit. Nach Erwärmung auf 42 ° C und Druckerhöhung bis auf ca. 80 bar (und somit über die kritische Temperatur und den kritischen Druck des CO₂ hinaus) wurde der Druck

durch kontrollierte Ausleitung des CO₂ abgelassen. Dies erfolgte zur Vermeidung von Verwirbelungen und einer Zerstörung der Proben über einen Zeitraum von mindestens 30 min. Die getrockneten Proben wurden halbiert und mit doppelseitigen Klebeplättchen so auf Stiftproben Tellern (PLANO GmbH, Wetzlar, D) fixiert, dass Vor- und Rückseiten der späteren Betrachtung zugänglich wurden.

5.6.2 Ionenstrahlputtern

Im Sputter Coater SCD 050 (BAL-TEC) erfolgte nach schrittweisem Aufbau eines Vakuums von mindestens 10⁻² mbar die Sputterdeposition. Hierzu wurde für 180 s eine Spannung von 570 V angelegt, die zum Beschuss einer Goldfolie (Target) mit Ionen des Edelgases Argon führte. Die dabei herausgelösten Goldatome kondensierten auf der Oberfläche der Proben. Dank der resultierenden homogenen Beschichtung waren die nach der Belüftung entnommenen Proben nun einer REM-Analyse zugänglich.

5.7 Immunhistochemie

Bei der Versuchsauswertung kamen immunhistochemische Färbungen zum Einsatz, um mittels spezifischer Antikörper (AK) das Vorliegen relevanter Zellmerkmale zu überprüfen. Hierbei wurde TE-7 zum Nachweis von FB verwendet. Für die Markierung von EC dienten CD31 und VE-Cadherin. Weiterhin wurden AK für die EZM-Bestandteile Fibronectin, Kollagen I / IV, Laminin und Elastin eingesetzt.

5.7.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Um am Schlittenmikrotom (HM 400 R, Microm GmbH, Walldorf, D) Schnitte für IHC-Färbungen herzustellen, wurden die Formalin-fixierten Proben zunächst in Einbettkassetten (LLG Labware, Meckenheim, D) überführt. Zur Optimierung der Sichtbarkeit wurden die Proben daraufhin 2 min in filtriertem Hämalaun (Merck KgaA) inkubiert sowie 3 min mit Leitungswasser gebläut. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 x 15 min EtOH 70 % vergällt, 3 x 15 min EtOH 96 % vergällt, 2 x 15 min EtOH absolut) mit Roti-Histol (Carl Roth GmbH + Co. KG) als Abschluss für 15 min. Zur Entfernung von Roti-Histol-Rückständen dienten drei Behälter mit bei 63 °C verflüssigtem Paraffin (Merck KgaA), in denen die entwässerten Proben der Reihe nach inkubiert wurden (im ersten Behälter über Nacht, im zweiten und dritten Behälter dann jeweils eine

Stunde). Anschließend wurden die Proben an der Einbettmaschine HistoCore Arcadia H (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) in Paraffin-Blöcke gegossen.

Nach dem Abkühlen und Aushärten der Probenblöcke wurden am Mikrotom Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Hierbei wurde der Paraffinblock mithilfe einer Kryomatrix (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) auf der Freezing Unit KS-34-S (HM 400 R, Microm GmbH) kontinuierlich gekühlt, um Paraffinschnitte möglichst hoher Qualität herstellen zu können. Die nach Überführung in ein beheiztes Paraffinstreckbad (MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster) auf Objektträger (Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, D) aufgezogenen Schnitte erfuhren eine Trocknung im Wärmeschrank (ED-115, Fa. BINDER GmbH) über Nacht bei 40 ° C.

5.7.2 Färbung von Paraffinschnitten mittels spezifischer Antikörper

Die Vorbereitung der Paraffin-Schnitte auf die IHC erfolgte unabhängig vom verwendeten AK für alle Färbungen einheitlich. Zur Entparaffinierung durchliefen die zunächst für 30 min auf 50 ° C erwärmten Objektträger nach Inkubation in Roti-Histol (2 x 15 min) eine absteigende Alkoholreihe von EtOH absolut (2 x 4 min) über EtOH 96 % (2 x 4 min) bis hin zu EtOH 70 % (2 x 4 min). Am Ende der Entparaffinierung wurden die zu färbenden Schnitte für 2 x 3 min in aqua dest (a. d.) sowie anschließend für weitere 2 x 3 min in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung vorhandener Zellen und ihrer Membranen erfolgte die Inkubation in PBS + 0,5 % TX über 10 min, gefolgt von erneut 2 x 3 min in a. d. sowie 2 x 3 min in PBS.

Vor Aufbringung der spezifischen AK kamen je nach Ziel-Antigen unterschiedliche Demaskierungsverfahren zum Einsatz. Diese dienten dazu, die in Folge der vorherigen Formalinfixierung vernetzten (maskierten) Zellmerkmale als Antigene für die Antikörper wieder zugänglich zu machen. Die jeweiligen Demaskierungsverfahren und Protein-Konzentrationen des spezifischen 1. AK (nach Verdünnung) sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Material und Methoden

Tabelle 3 Verwendete AK und Protokolle in der Immunhistochemie

Humanes Antigen des AK	Demaskierungsverfahren	AK-Protein-Konzentration
TE-7	20 min Kochen in EDTA-Lösung pH 8,0 (0,1 mM in a. d.)	1,7 µg/ml
CD31	15 min Kochen in Tris/EDTA-Lösung pH 9.0 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA)	10,25 µg/ml
VE-Cadherin (CD144)	15 min Kochen in Target-Retrieval-Lösung pH 6,0 (Target Retrieval Solution 10x, in a.d. 1:10 verdünnt)	10 µg/ml
Kollagen I	6 min Proteinase (25 µg/ml = 2,8 mU / ml) bei RT in feuchter Kammer	1 µg/ml
Kollagen IV		26,4 µg/ml
Fibronectin		0,24 µg/ml
Elastin		Ausgangslösung 1:50 verdünnt
Laminin		96 µg/ml

Zum Kochen gebracht wurden die in Pufferlösung gelagerten Objektträger in Kunststoff-Färbetrögen (Kartell Labware, Noviglio, Italien) bei ca. 180 W in einer Mikrowelle (Siemens AG, München, D). Die Leistung wurde hierbei individuell angepasst, um eine Austrocknung zu verhindern.

Zwischen Demaskierung und AK-Zugabe erfolgten (nach Abkühlen im Falle des vorausgegangenen Kochens über 20 min) 2 x 3 min Spülen in a. d. sowie 2 x 3 min Spülen in PBS, eine Inkubation in 200 ml PBS + 0,8 ml H₂O₂ (Sigma Aldrich Chemie GmbH) über 10 min zur Sättigung zelleigener (endogener) Peroxidasen und erneut 2 x 3 min Spülen in a. d. sowie 2 x 3 min Spülen in PBS. Auf jeden Schnitt wurden 40 µl des jeweiligen AK aufgebracht, dessen Ausgangslösung zuvor in Abhängigkeit der gewünschten Protein-Konzentration mit Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) verdünnt wurde. Bei jeder Färbung wurden Proben als Negativkontrolle ohne AK-Auftragung mitgeführt.

Der Ansatz ruhte in einer feuchten Kammer bei 4 °C für mindestens 16 h, ehe Waschschritte in PBS sowie in PBS mit 0,05 % Polyalkylenglycoether (BRIJ® 35, Merck KGaA) über je 2 x 3 min zur Herabsetzung der Oberflächenspannung folgten. Lag das Zielantigen in einer Probe vor, blieb der daran gebundene erste AK bei diesen Schritten erhalten und konnte Komplexe mit einem biotinylierten zweiten AK bilden, mit dem die Proben anschließend für 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS (2 x 3 min) und PBS + BRIJ® 35 (2 x 3 min) wurde diesem Komplex eine Streptavidin-konjugierte Meerrettich-

Material und Methoden

Peroxidase (= Horseradish Peroxidase, HRP) zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 10 min in einer feuchten Kammer und Wiederholung der Waschschriffe wurde eine Gebrauchslösung auf Basis des Chromogens 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zugegeben (5 ml a. d. + 2 gtt Pufferlösung + 3 gtt Farbsubstrat + 2 gtt H₂O₂), die 10 min in einer feuchten Kammer einwirkte. Nach Spülung in a. d. (2 min) und einer Kernfärbung mit unverdünnter, filtrierter Hämalaunlösung (2 min) erfolgten das Bläuen in Leitungswasser und das Eindecken mit wässrigem Eindeckmedium (Dako Deutschland GmbH).

Die AK-Zielstrukturen sind in den erzeugten Präparaten bei lichtmikroskopischer Betrachtung durch die lokale, HRP-katalysierte Entstehung eines rötlichen Farbsignals zu erkennen. Die Fotografie und digitale Archivierung der Aufnahmen erfolgte in den Vergrößerungen 4x, 10x und 20x mit der Software IM50 am Durchlichtmikroskop DMR mit USB-Keramodul DC200 (Leica Microsystems GmbH).

5.8 Fluoreszenzmikroskopie vitaler und letaler Zellen

Für eine Vital-Letal-Färbung (Live / Dead, LD) wurden ohne Zeitverzug im selben Ansatz Propidiumjodid (PI, Sigma Aldrich Chemie GmbH) und *SYTO 9* (LifeTechnologies GmbH, Darmstadt, D) zugegeben, um eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung vitaler und letaler Zellen zu ermöglichen. *SYTO 9* färbt die DNS und RNS *vitaler* Zellen unter Penetration ihrer Zellmembran an, wohingegen die DNS und RNS *letaler* Zellen mit geschädigter Membran durch Interkalation von PI gefärbt wird.

Zur Betrachtung der Proben in einer 12-Well-Platte (Becton Dickinson GmbH) wurden nach Ende einer Besiedelung für jeden zu untersuchenden Scaffold 500 µl des resuspendierten Nährmediums zurückbehalten. Dessen Gesamtvolumen variierte in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuchsaufbau. Überschüssiges Restmedium wurde zum Ausschluss relevanter verbliebener Zellzahlen (> 20 % der eingebrachten Menge) einer Zellzählung zugeführt, analog dem Vorgehen aus 5.2.6. In einem Reaktionsgefäß wurden bei RT zunächst 100 µl des Nährmediums mit PI und *SYTO 9* gemischt und anschließend mit den restlichen 400 µl wieder dem Probenmaterial zugegeben. Bei Verwendung größerer oder kleinerer Zellkulturplatten wurden die Volumina in Abhängigkeit der Well-Größe

Material und Methoden

proportional angepasst. Unabhängig davon wurde, ausgehend von Aliquots der bei -20°C gelagerten Stocklösungen ($c_{\text{PI in PBS}} = 25\text{ mM}$ / $c_{\text{Syto 9 in DMSO}} = 5\text{ mM}$), eine Endkonzentration von $c_{\text{PI}} = 50\text{ }\mu\text{M}$ / $c_{\text{Syto 9}} = 5\text{ }\mu\text{M}$ herbeigeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie unter dem Axio Observer Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH) erfolgte unverzüglich und unter Lichtausschluss bei 10-facher Vergrößerung mit manuellem Fokus der z-Ebene und automatischer Belichtung. Durch Anregung mit Licht einer Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\text{Abs}} = 485\text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{Abs}} = 540\text{ nm}$ konnten Aufnahmen generiert werden, in denen vitale Zellen grün erscheinen (Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 500\text{ nm}$) und letale Zellen rot ($\lambda_{\text{Em}} = 608\text{ nm}$). Aufnahmen im Hellfeld zur Betrachtung der Probenbeschaffenheit an der untersuchten Stelle wurden jeweils mit archiviert. Die im Anschluss an die dynamischen Rezellularisierungsversuche mit EC untersuchten Proben wurden an jeweils drei Positionen ihrer Vorder- und Rückseiten fotografiert, wobei Vital- und Letal-Signale mit automatisierter Belichtung einzeln erfasst und zur besseren Veranschaulichung in einer gemeinsamen Darstellung überlagert wurden.

In Folge der vorausgegangenen mechanischen und chemischen Manipulationen zeigten Proben oft eine unebene Oberflächenbeschaffenheit. Hier genügte die Aufnahme in einer z-Ebene nicht, um alle Zellsignale deutlich zu erfassen. In diesen Fällen wurden mehrere Aufnahmen in einheitlichen Abständen angefertigt, die als „Z-Stapel“ von der Mikroskop-Software (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss MicroImaging GmbH) vereinigt wurden. Die unbearbeiteten Rohdaten wurden jeweils im proprietären Format *Zeiss Vision Image* (ZVI) archiviert.

Nach der Re-Zellularisierung der EZM-haltigen Scaffolds mit EC dienten die erhobenen LD-Aufnahmen einer größtenteils automatischen Zellzählung mit der Software „ImageJ“. Eine manuelle Zählung war aufgrund der Vielzahl der Aufnahmen sowie der großen Zellzahl pro Bild nicht praktikabel. Daher wurde nach Anleitung des Kapitels „Automated Counting of Single Color Images“ in „Two Ways to Count Cells with ImageJ“ von Labno (University of Chicago) vorgegangen [77].

Dem Programm wurden zur separaten Erfassung vitaler und letaler Zellen jeweils einfarbige (= auf einen Fluoreszenzkanal begrenzte) Aufnahmen mit kompatibelem Dateiformat in Graustufen zugeführt (Abbildung 5-5 A), die zu zählenden Zellen bestmöglich durch geeignete Programmfunktionen herausgearbeitet (Abbildung 5-5 B) und die resultierenden binären (schwarz-weißen) Bilder (Abbildung 5-5 C)

Material und Methoden

automatisiert ausgezählt (Abbildung 5-5 D). Weitergehende Erläuterungen sind dem Begleittext der Abbildung zu entnehmen. Abschließend erfolgte die Sammlung der generierten Messwerte (Abbildung 5-5 E) in Tabellen zur statistischen Auswertung in Microsoft Excel, um Vergleiche zwischen Vor- und Rückseiten der Proben sowie den zugrunde liegenden Dezellularisierungsgruppen zu ermöglichen.

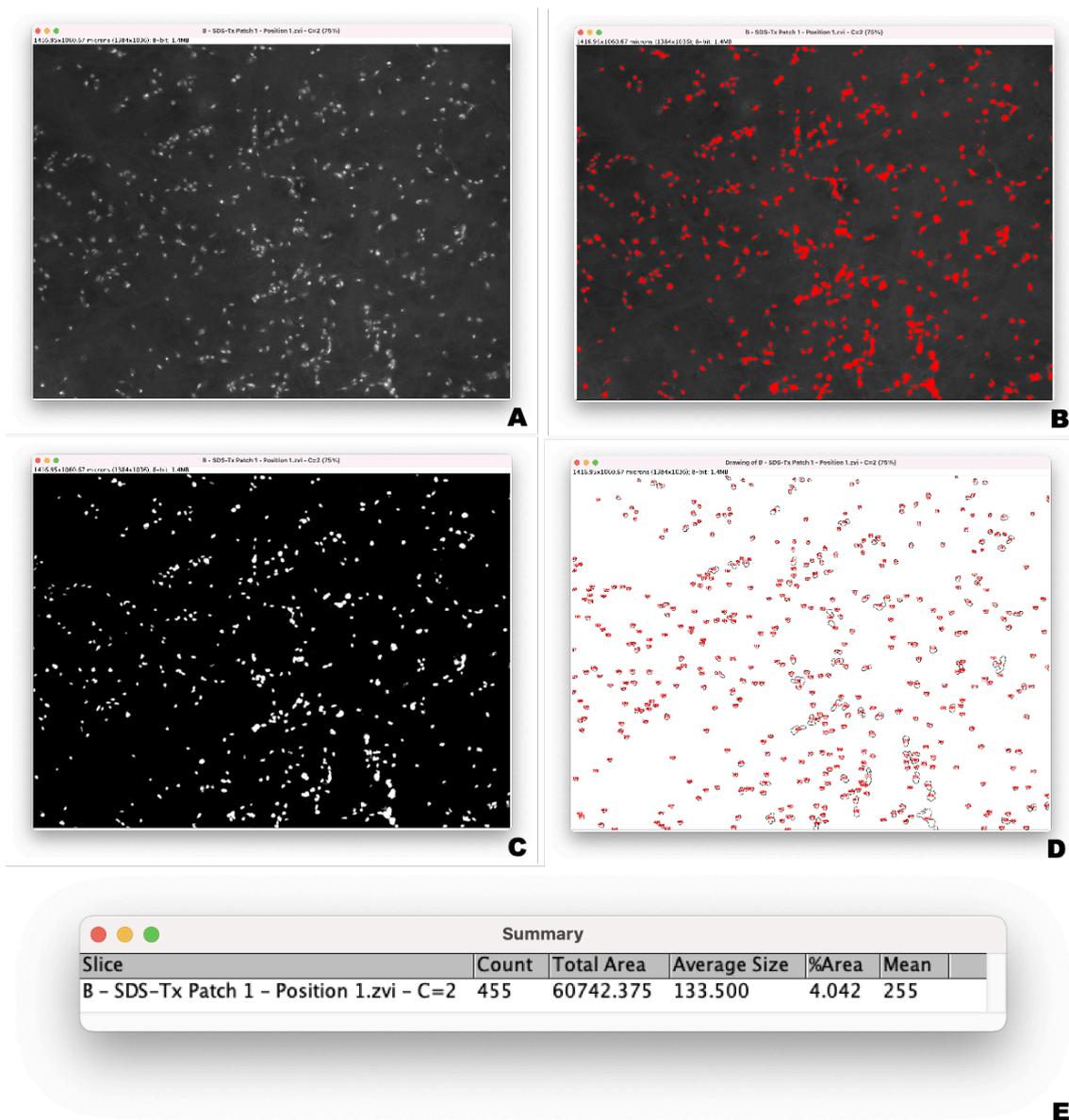


Abbildung 5-5 Exemplarische Durchführung einer weitgehend automatisierten Zellzählung in "ImageJ": Aufnahmen einzelner Fluoreszenzkanäle im Graustufen-Format (A) wurden durch von der Probenbeschaffenheit abhängige Treshold-Anpassung optimiert (B), wobei individuell pro Bild gesetzte Schwellenwerte für die Pixelintensität die Zellen (= in B rot hervorgehobene Partikel) automatisch erfassbar machten. Es resultierte ein binäres Bild mit weißen Objekten (= zu zählenden Zellen) vor schwarzem Hintergrund (C), in dem ggf. mittels „Watershed“-Funktion eine Trennung nebeneinander liegender Zellen zwecks separater Erfassung vorgenommen wurde (hier nicht dargestellt). Den anschließenden Zählschritt („Analyze Particles“) unter manueller Festlegung einer Mindestgröße zu erfassender Partikel veranschaulicht das visualisierte Ergebnis mit schwarz umrandeten und rot durchnummerierten Zellen (D). Das tabellarische Ergebnis der Zählung (E) floss in die anschließende statistische Auswertung ein.

6. Ergebnisse

6.1 Rasterelektronenmikroskopie

6.1.1 Natives PU im Vergleich zum Zustand nach FB-Besiedelung

Im nativen Zustand zeigte das elektrogewebene PU eine mehrschichtige, netzartige Struktur ohne erkennbare Ordnung. Die Fasern schwankten geringfügig in ihrem Durchmesser und wiesen in loser Verteilung punktuelle Verdichtungen auf (in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt in Abbildung 6-1, A und B). Die Oberflächenstruktur zeigte sich in den untersuchten Arealen randständig wie auch mittig insgesamt homogen. Auffällig waren leichte makroskopische und haptische Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten PU-Chargen. In der REM-Betrachtung objektivierbare Abweichungen fanden sich hingegen nicht.

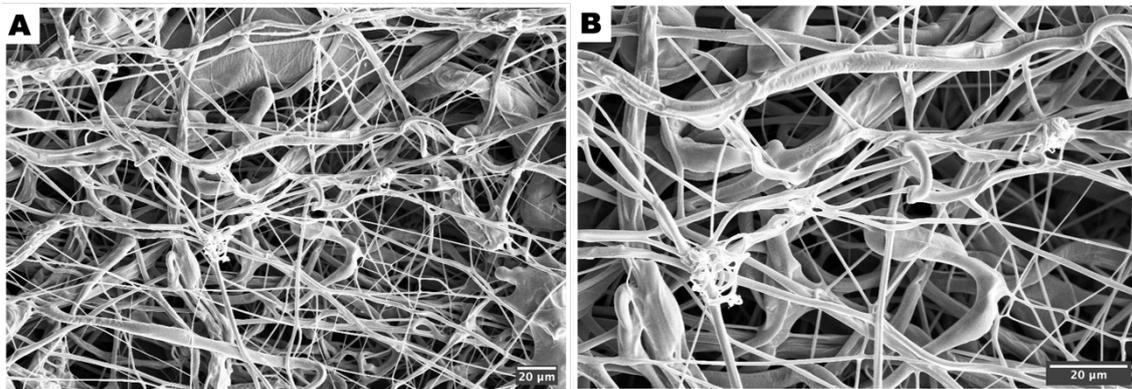


Abbildung 6-1 REM-Nativproben des als Zellträger verwendeten PU in 1000-facher (A) bzw. 2000-facher Vergrößerung (B): Zu erkennen sind die mehrschichtige Netzstruktur und punktuelle Verdichtungen.

Nach Aussaat von FB auf PU ($750.000 \text{ Zellen/cm}^2$) mit Inkubation über 10 Tage zeigten die REM-Proben von vier der fünf Versuchsdurchgänge homogene Oberflächen mit vollständiger Überdeckung der ursprünglichen PU-Netzstruktur (Abbildung 6-2, A + B). Der Aspekt ähnelte nebeneinander liegenden Decken mit Einziehungen am Übergang zwischen den unterschiedlichen Abschnitten. Innerhalb der biologischen Deckschicht ließen sich FB-typische spindelförmige Strukturen erkennen. Die Oberflächenschicht konnte in Proben aus mittigen und randständigen Bereichen der Patches gleichermaßen dargestellt werden. Besonders deutlich wurde die Qualität der Beschichtung im unmittelbaren Vergleich mit den Rückseiten der PU-Proben (Abbildung 6-2, C + D), die bei der Besiedelung nicht mit Zellen in Kontakt gebracht worden waren. Hier zeigte sich die Struktur unverändert gegenüber dem nativen Ausgangsmaterial (vgl. Abbildung 6-1).

Ergebnisse

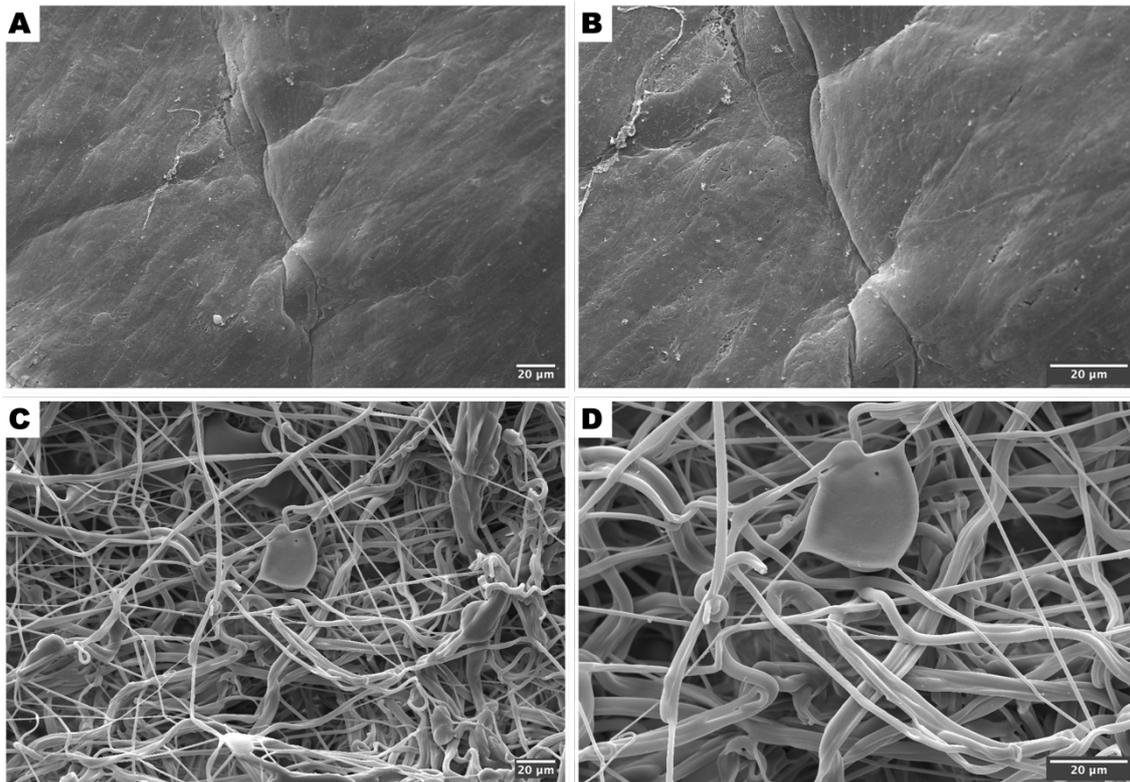


Abbildung 6-2 REM-Nachweis einer homogenen Oberfläche nach PU-Beschichtung mit FB und Inkubation über 10 Tage (A, B) im Vergleich zu unbehandelten Rückseiten mit einer dem Nativ-Zustand gleichenden Netzstruktur (C, D)

Einer der fünf Versuchsdurchgänge der FB-Beschichtung zeigte in der REM-Betrachtung eine Beschichtung mit gehäuften Auflockerungen und rissartigen Aussparungen (Abbildung 6-3 A), die in den restlichen Versuchsgruppen nur sporadisch nachweisbar waren. Höhere Vergrößerungen brachten auf den Patches der betroffenen Gruppe trotz Antibiotikazusatz in den verwendeten Nährmedien stäbchenförmige Mikroorganismen zur Darstellung (Abbildung 6-3 B).

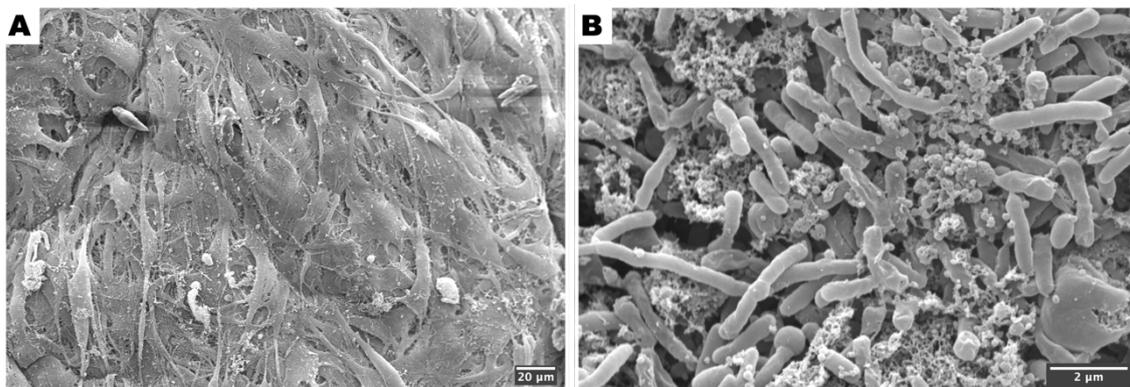


Abbildung 6-3 REM-Darstellung von Auflockerungen und Rissen in der ausgebildeten Beschichtung (A) nach FB-Besiedelung von PU mit Inkubation über 10 Tage (Versuchsdurchgang 2). Bei näherer Untersuchung fanden sich stäbchenförmige Mikroorganismen (B).

6.1.2 Dezellularisierung und EZM-Erhalt

Die nach Dezellularisierung in den Gruppen A und B angefertigten REM-Proben zeigten für beide Verfahren bei den Scaffolds der sterilen Durchgänge eine gut erhaltene biologische Oberflächenstruktur (Abbildung 6-4 A: SD-SDS // B: SDS-TX). Risse und Unterbrechungen in der wie unter 6.1.1 beschrieben erhaltenen Deckschicht gelangten nicht zur Darstellung. Die für das Vorliegen von FB sprechenden spindelförmigen Strukturen waren nicht mehr nachweisbar. Beginnend bei 5.000-facher und deutlicher bei 10.000-facher Vergrößerung bestand gruppenunabhängig eine minimale Auflockerung der Deckschicht gegenüber dem Zustand vor Dezellularisierung. Frei liegende PU-Fasern wurden aber auch bei hohen Vergrößerungen lediglich an den äußeren Rändern der Proben sichtbar und entsprechen am ehesten Verarbeitungsartefakten. Die Oberfläche des zuvor von Mikroorganismen kompromittierten Beschichtungsdurchgangs 2 (vgl. Abbildung 6-3) zeigte sich nach Dezellularisierung stark degradiert (Abbildung 6-4 C) und erinnerte an das ursprüngliche native PU (Abbildung 6-4 D). Diese Veränderung bestand in beiden Dezellularisierungsgruppen.

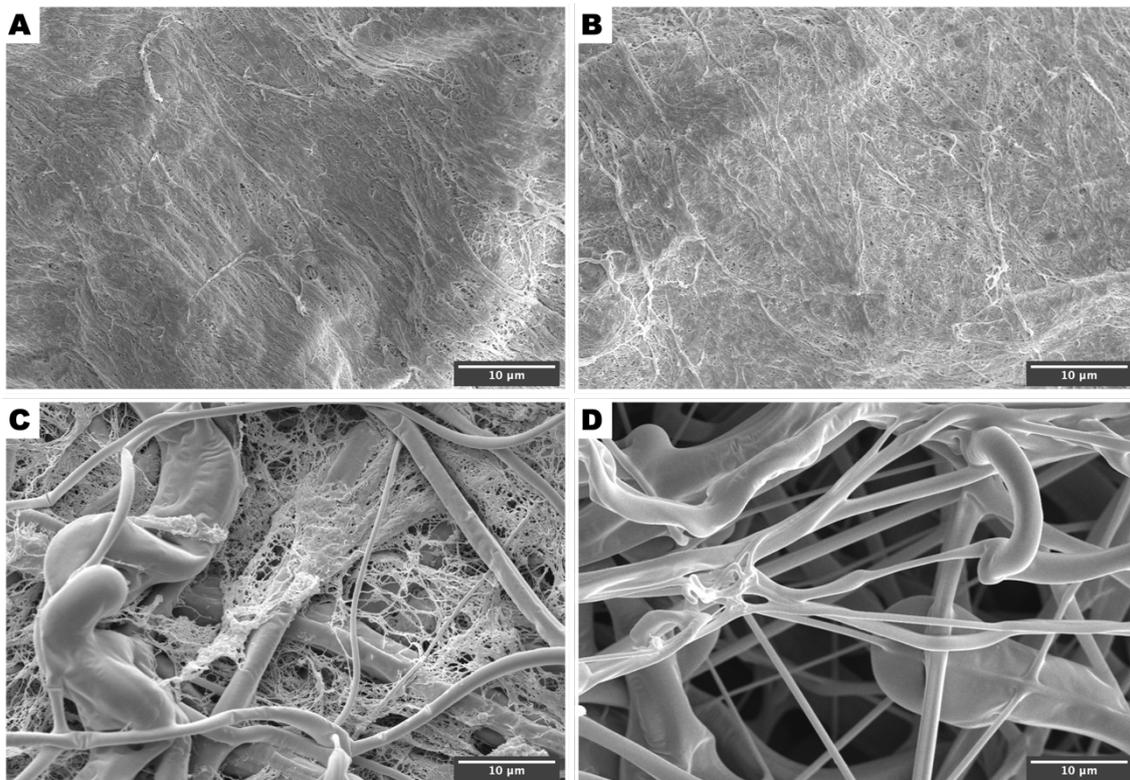


Abbildung 6-4 Repräsentative REM-Aufnahmen zur Untersuchung des EZM-Erhalts nach Dezellularisierung beschichteter PU-Proben. Es zeigte sich ein vergleichbarer Erhalt der Deckschicht in den Gruppen SD-SDS (A) und SDS-TX (B). Scaffolds des zuvor von Mikroorganismen bewachsenen Beschichtungsdurchgangs 2 (C) zeigten – hier exemplarisch in der Gruppe B (SDS-TX) dargestellt – eine im Vergleich deutlich stärkere Degradation der Deckschicht mit Annäherung an den Aspekt nativen PUs (D).

6.1.3 Erfolg der dynamischen Rezellularisierung mit EC

REM-Proben nach der dynamischen Rezellularisierung der Scaffolds mit EC zeigten über alle zehn Versuchsdurchgänge hinweg die Ausbreitung von Zellstrukturen. Diese überwog mal mehr, mal weniger deutlich jeweils auf der EZM-bedeckten, initial mit FB besiedelten Scaffold-Seite. In den Proben der steril gebliebenen Beschichtungsdurchgänge zeigte sich an vielen Stellen ein charakteristisches Pflastersteinrelief (Abbildung 6-5 A / B). Als Grundlage für diese Organisation war ein (noch nicht vollständig konfluenter) Monolayer von rundlichen, glatt begrenzten und dicht aneinander liegenden Strukturen zu erkennen, deren Durchmesser im Bereich um 20 μm lag. Die Ausprägung des Reliefs schwankte leicht von Probe zu Probe, zeigte jedoch keine erkennbare Abhängigkeit vom verwendeten Dezellularisierungsprotokoll.

Erkennbar weniger dicht zeigte sich das Relief, ebenfalls ohne erkennbaren Unterschied zwischen den Dezellularisierungsprotokollen, auf Scaffolds des vormals von Mikroorganismen besiedelten FB-Besiedelungsdurchgangs (Abbildung 6-5 C). Dennoch war auch hier angedeutet eine beginnende Ausbreitung der beschriebenen Strukturen zu erkennen.

Die korrespondierenden Probenrückseiten zeigten weitgehend frei liegende PU-Fasern ohne Anzeichen einer konfluenten Deckschicht (Abbildung 6-5 D).

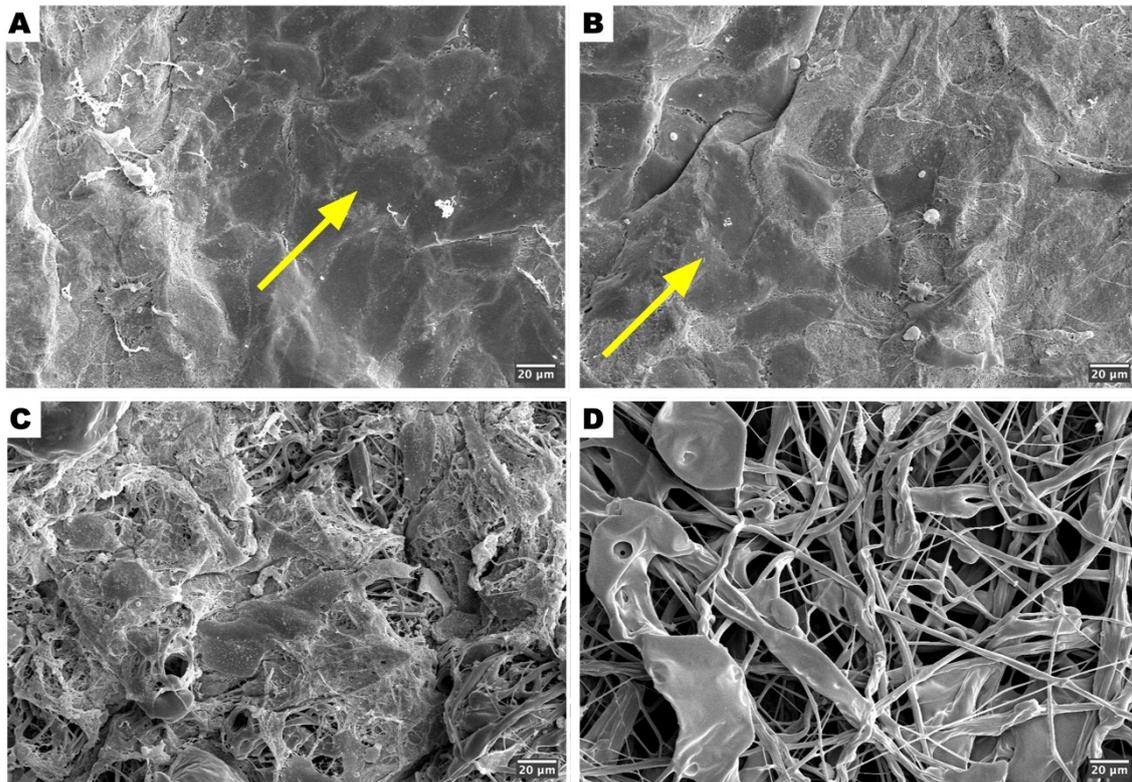


Abbildung 6-5 REM-Proben nach dynamischer Rezellularisierung mit EC eines SD-SDS- (A) bzw. SDS-TX- (B) dezellularisierten EZM-haltigen Scaffolds. Es zeigte sich ein beginnend konfluentes Pflastersteinrelief aus rundlichen, glatt berandeten Strukturen (in Aufnahme A flächig in der rechten Bildhälfte bzw. in Aufnahme B linksseitig betont; siehe gelbe Pfeile). Angedeutet zeigte sich dies auch in dem Durchgang, der Kontakt zu Mikroorganismen hatte (C). Eine zu A bzw. B korrespondierende Probenrückseite (D) zeigte zahlreiche frei liegende PU-Fasern ohne Bildung einer konfluenten Deckschicht.

6.1.4 Beschaffenheit der Scaffolds nach Lagerung über 365 Tage

Zurückbehaltene Scaffold-Segmente wurden nach 365-tägiger Lagerung wie vorbeschrieben fixiert und im REM analysiert. Die untersuchten Flächen zeigten hierbei eine größtenteils sehr gut erhaltene, weiterhin konfluente Beschichtung mit einem etwas raueren, weniger planen Aspekt als bei den ursprünglichen Proben. Diesbezüglich glichen sich die Ergebnisse aus der SD-SDS-Gruppe (Abbildung 6-6 A + B), und der SDS-TX-Gruppe (Abbildung 6-6 D + E). Nur an vereinzelten Stellen kam eine umschriebene Freilegung tieferer PU-Fasern zur Darstellung; dies betraf gleichermaßen die SD-SDS-Gruppe (Abbildung 6-6 C) wie die SDS-TX-Gruppe (Abbildung 6-6 F). Die zuvor bereits weniger konfluent bedeckten Scaffolds des mit Mikroorganismen kompromittierten Beschichtungsdurchgangs zeigten gegenüber dem Status vor Langzeitlagerung keine relevante zusätzliche Abnahme der Oberflächenintegrität.

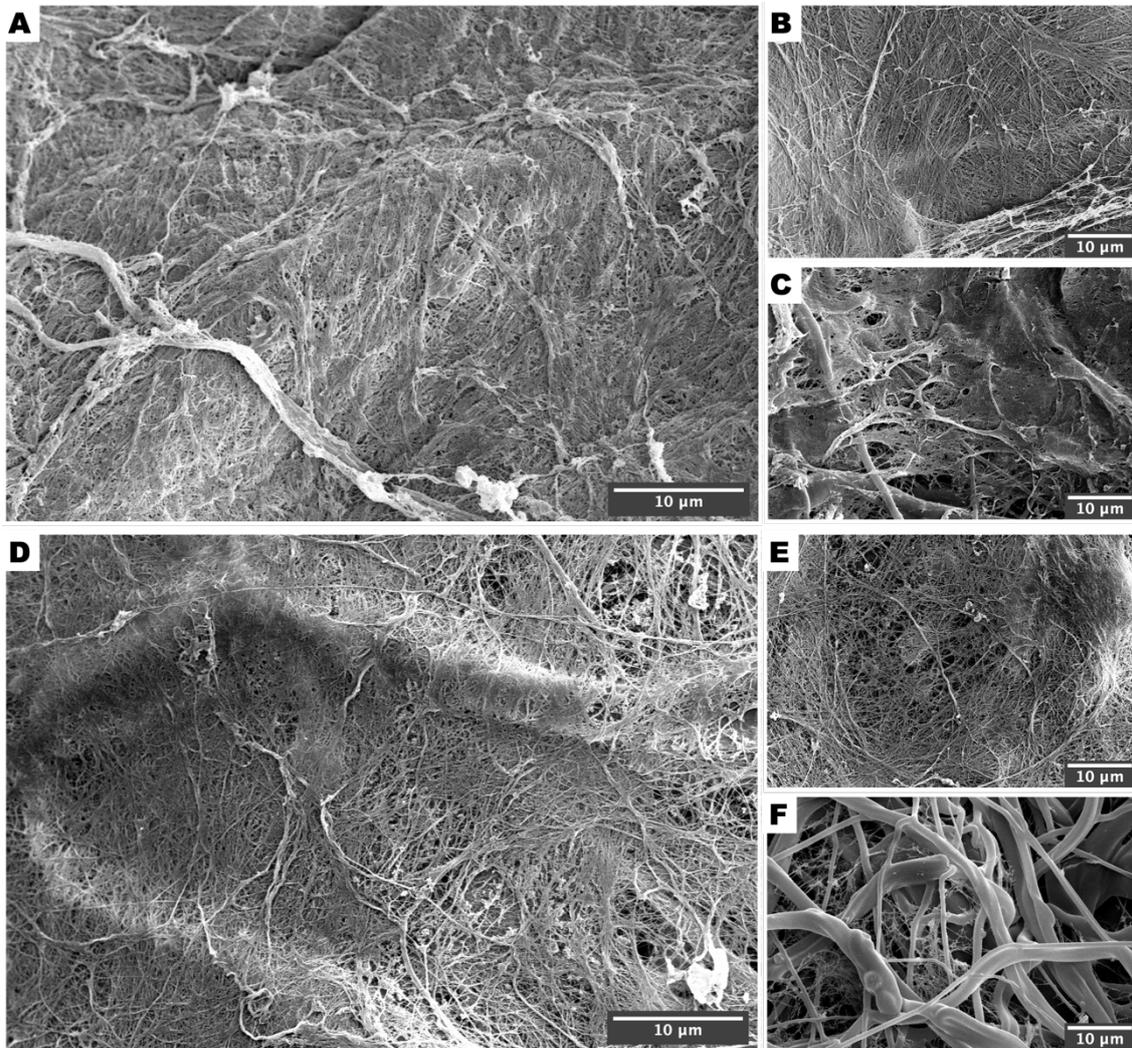


Abbildung 6-6 Repräsentative Auswahl von REM-Bildern EZM-haltiger Scaffolds nach 365 Tagen Lagerung in PBS / PenStrep 0,2 % (A bis C: Dezellularisierungsgruppe SD-SDS / D bis F: Dezellularisierungsgruppe SDS-TX). Großteils zeigte sich nur eine geringe (A, D) bis mäßige (B, E) Aufrauung der weiterhin flächig bedeckten Untersuchungsmaterialien. Defekte und starke Degradation waren nur sehr punktuell festzustellen (C, F).

6.1.5 Ergebnis des Aufnähens von Venengrafts

Abschließende REM-Aufnahmen nach Kombination von Venengrafts mit den EZM-haltigen Scaffolds über 21 Tage zeigten in allen untersuchten Proben die Ausbildung einer zusätzlichen neuen Oberflächenschicht aus einer Vielzahl zellartiger Strukturen. Zuvor war ein überdurchschnittlich hoher Verbrauch an Zellkulturmedium festzustellen gewesen. Die Oberflächenschicht dehnte sich von der Kontaktfläche zwischen Venengraft und Scaffold gleichmäßig in alle Richtungen aus. Regelmäßig erreichte sie auch den von der Nahtstelle aus betrachtet nächstgelegenen Scaffold-Rand (Abbildung 6-7 A). Systematische Erhebungen der Auswachsdistanz in den Bezirken, wo dies nicht erreicht wurde, waren durch eine bei der REM-Proben-Vorbereitung teils unvermeidliche Ablösung der aufliegenden

Ergebnisse

Venengrafts von den Scaffolds nicht möglich. In den nicht bis zum Rand zellbedeckten Scaffold-Abschnitten zeigten die nicht bewachsenen Areale eine zwar leicht degradierte, aber doch weitgehend homogene EZM (Abbildung 6-7 B).

Bei näherer Betrachtung der bewachsenen Scaffoldareale zeigten diese vielfach den Aspekt eines Pflastersteinreliefs, wie er als typisch für EC gilt. Das Relief zeigte eine großflächige und homogene Bedeckung der Scaffolds beider Dezellularisierungsgruppen mit geringfügig gleichmäßigerer Beschaffenheit in der Gruppe SD-SDS (Abbildung 6-7 C). Seltener kamen Abschnitte mit FB-typischen länglichen, spindelförmigen Strukturen zur Darstellung (Abbildung 6-7 D).

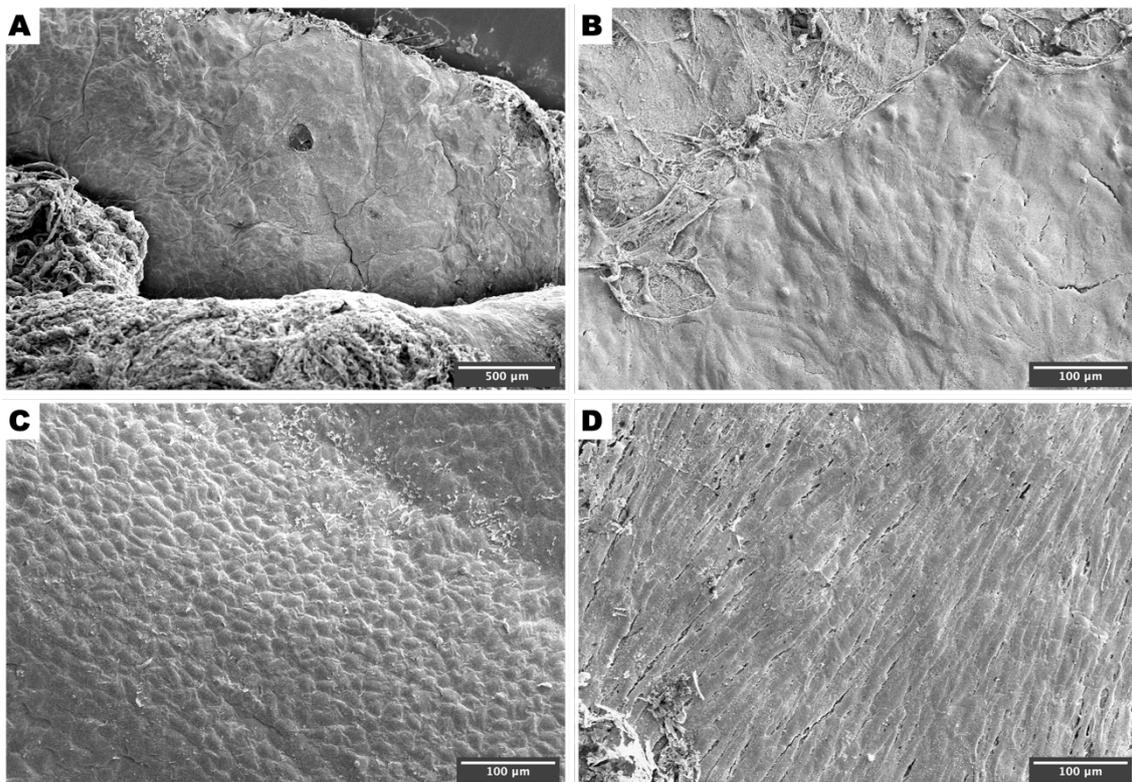


Abbildung 6-7 Repräsentative Auswahl von REM-Bildern nach dem Rezellularisierungsversuch mit Aufnähen von Venengrafts auf EZM-haltigen Scaffolds (hier am Beispiel von SD-SDS). Ausgehend von den aufgenähten Venengrafts (A, unteres Bilddrittel) erstreckt sich eine Schicht zellartiger Strukturen (A, oben) bis an den nächstgelegenen Scaffold-Rand. In nicht vollständig zellbedeckten Scaffold-Abschnitten war eine leicht degradierte, aber doch weitgehend homogene EZM zu sehen (B, oben links). Die genauere Betrachtung der ausgewachsenen Zellschicht erbrachte vielfach den Nachweis eines großflächigen, homogenen „Pflastersteinreliefs“ passend zu EC (C). Ebenso fielen Abschnitte mit FB-typischen länglichen Spindeln auf (D).

6.2 Immunhistochemie

6.2.1 Nachweis von FB- und EZM-Markern nach Besiedelung des PU

Immunhistologisch zeigten alle PU-Proben nach FB-Besiedelung und Inkubation über 10 Tage ein stark positives Signal für den FB-Marker **TE-7** (Abbildung 6-8 A), das nur in den Proben des mikrobiell kontaminierten Versuchsdurchgangs schwächer ausfiel. Die Anfärbung ließ mittig und auch in Randbereichen jeweils eine homogene, durchgehende Deckschicht erkennen. Die EZM-Marker Fibronectin, Laminin und Elastin sowie – in geringerer Ausprägung – Kollagen I / IV zeigten stark positive Farbsignale in Form einer konfluenten Oberflächenschicht auf dem Zellträger. Exemplarisch zeigt Abbildung 6-8 dies anhand der Färbungen gegen Fibronectin (B) und Laminin (C). Die Färbung gegen den EC-spezifischen Marker **CD31** erbrachte auf allen Proben ein negatives Ergebnis (Abbildung 6-8 D).

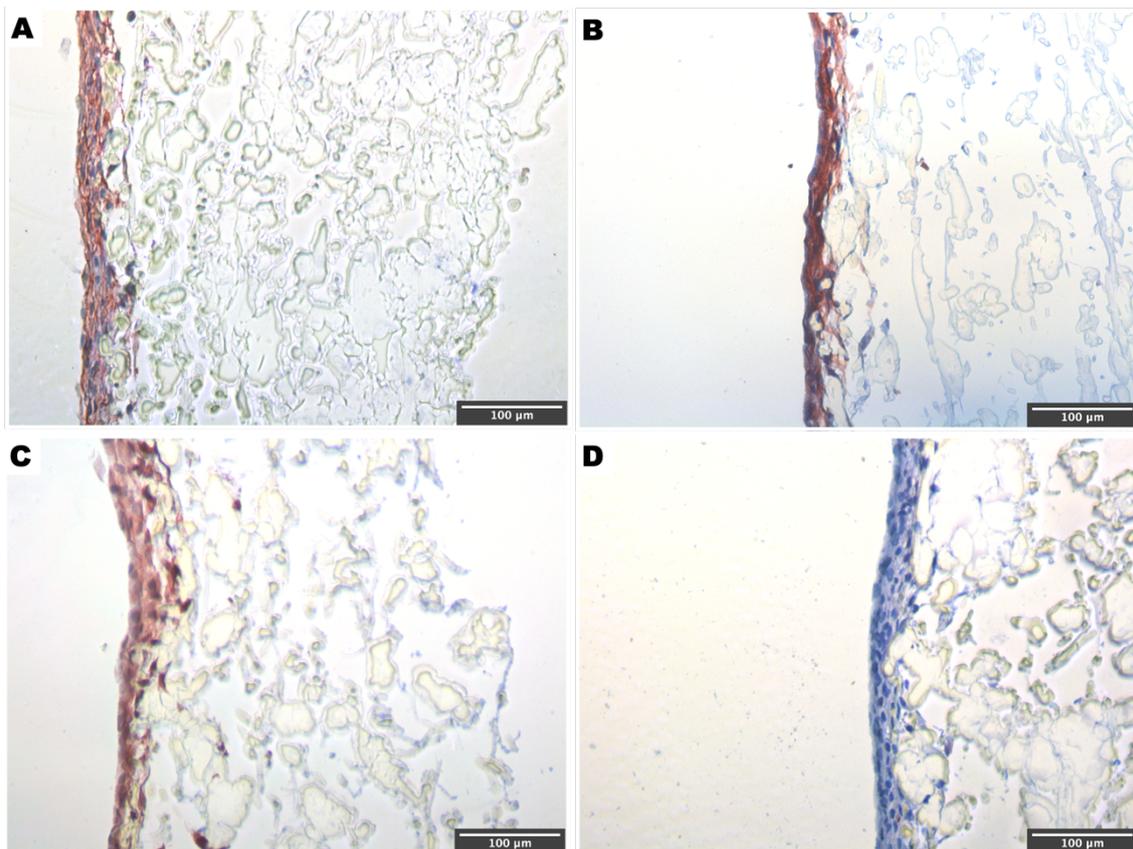


Abbildung 6-8 IHC-Nachweise nach FB-Besiedelung auf PU mit Inkubation über insgesamt 10 Tage: Stark positive Signale (rotbraun) in Form einer durchgehenden homogenen Oberflächenbedeckung wurden für den FB-Marker TE-7 (A) und EZM-Marker wie Fibronectin (B) und Laminin (C) detektiert. Der EC-Marker CD31 (D) blieb negativ.

Ergebnisse

In Tabelle 4 ist die Auswertung aller IHC-Färbungen zusammengefasst, die nach der FB-Besiedelung angefertigt wurden. Passend zu den REM-Ergebnissen war die Intensität FB- und EZM-spezifischer Signale einzig in dem mit Mikroorganismen kontaminierten Durchgang 2 leicht herabgesetzt. Dennoch zeigten sich auch hier in der gesamthaften Betrachtung immer noch für alle relevanten Marker eindeutig positive Signale.

Tabelle 4 Zusammenfassung der IHC-Untersuchungsergebnisse nach FB-Besiedelung auf PU mit anschließender Inkubation über 10 Tage. Die Quantifizierung des Farbanschlages dient als Hinweis auf das Ausmaß der Antigenexpression (0 = kein Farbsignal / + = schwach positiv / ++ = stark positiv).

	Zellnachweis		EZM-Nachweis				
	TE-7	CD31	Fibronectin	Laminin	Elastin	Kollagen I	Kollagen IV
Durchgang 1	++	0	++	+	+	+	++
Durchgang 2	+	0	++	+	+	+	+
Durchgang 3	++	0	++	++	++	+	+
Durchgang 4	++	0	++	++	++	+	++
Durchgang 5	++	0	++	++	++	+	+

Auffällig war in der IHC nach FB-Besiedelung des PU der vereinzelte Nachweis von Konglomeraten unklarer Differenzierung mit einer Längsausdehnung bis etwa 200 µm. Solche Veränderungen fanden sich in Patches der Durchgänge 3 und 5 und kamen als dem PU aufliegende Ballung zellkernförmiger Strukturen zur Darstellung. In ihrer Umgebung erbrachte die Anfärbung gegen TE-7 negative Ergebnisse (Abbildung 6-9 A); es zeigte sich aber ein deutlich positives Laminin-Signal (B). Marker wie CD31 und Kollagen IV konnten nicht nachgewiesen werden.

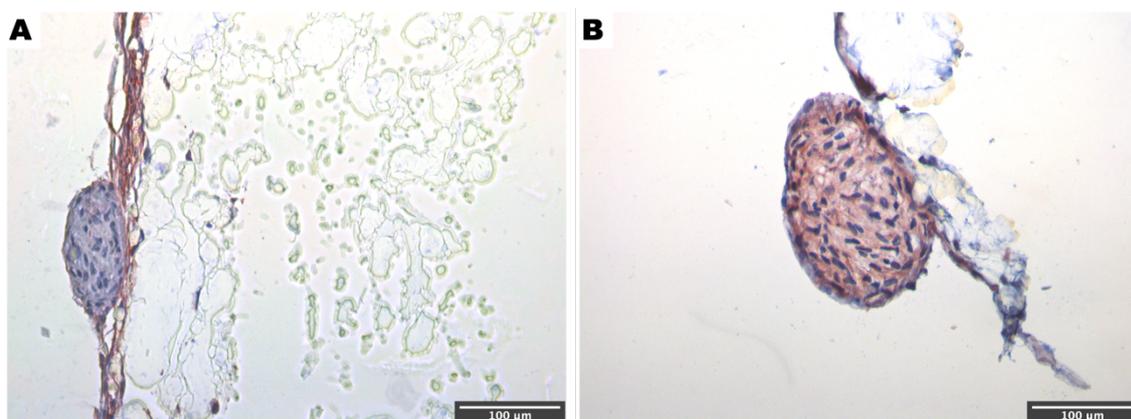


Abbildung 6-9 IHC-Nachweis einzelner Zellkonglomerate nach FB-Besiedelung von PU über 10 Tage. Während die Beschichtung ober- und unterhalb der Konglomerate angefärbt ist, zeigte das Konglomerat selbst keinen Farbanschlag bzgl. TE-7 (A) oder anderen Zell- bzw. EZM-Markern. Einzig die Laminin-Färbung fiel stark positiv aus (B).

6.2.2 Dezellularisierung und EZM-Erhalt

Nach Fertigstellung der Scaffolds durch Dezellularisierung der FB-besiedelten, EZM-haltigen PU-Patches wurden erneut IHC-Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich eine erhaltene Expression der bereits zuvor stark positiv anfärbbaren EZM-Marker Fibronectin, Laminin und Elastin. Der Nachweis konnte gleichermaßen für die Gruppen SDS-TX (Abbildung 6-10, A + C) und SD-SDS (B + D) geführt werden.

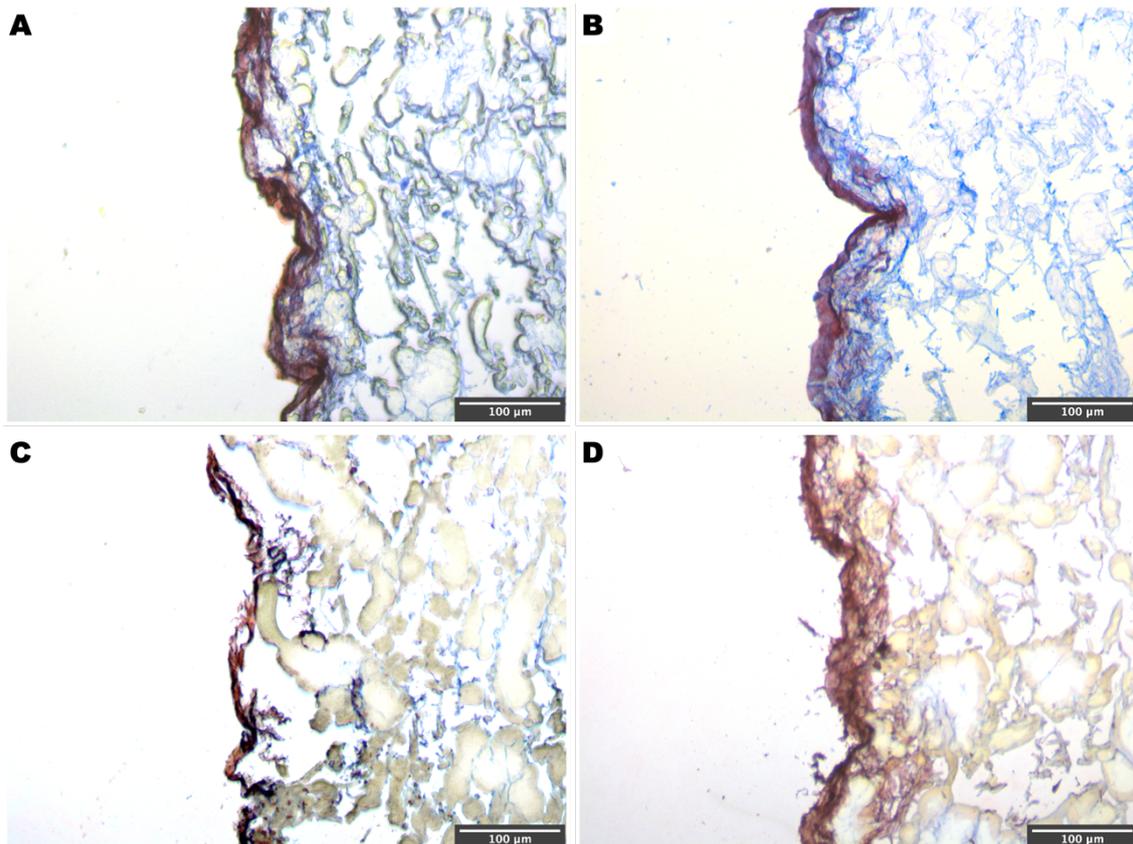


Abbildung 6-10 Repräsentative Auswahl von IHC-Färbungen auf EZM-Marker nach Dezellularisierung. Obere Reihe: positiver Fibronectin-Nachweis des Besiedelungs-Durchgangs #1 in der Gruppe SDS-TX (A) bzw SD-SDS (B). Untere Reihe: positiver Elastin-Nachweis des Besiedelung-Durchgangs #4 in der Gruppe SDS-TX (C) bzw. SD-SDS (D).

Ein teilweise breiter wirkender Aspekt der angefärbten Oberflächenschicht in der SD-SDS-Gruppe koinzidierte mit einer dezenten mikroskopischen Auflockerung und Breitenzunahme der gesamten Scaffolds dieser Dezellularisierungsgruppe. Die schon nach der primären Beschichtung nur schwach positiven Färbungen gegen Kollagen I und IV erbrachten kein positives Farbsignal mehr.

Ergebnisse

In der SD-SDS-Gruppe waren nach den Dezellularisierungs- und Waschschritten noch vereinzelte schwach positive Signale für den FB-Marker TE-7 mit abgrenzbaren Zellkernen detektierbar (Abbildung 6-11 A). Innerhalb der SDS-TX-Gruppe war dies bei keiner Probe festzustellen (exemplarisch Abbildung 6-11 B).

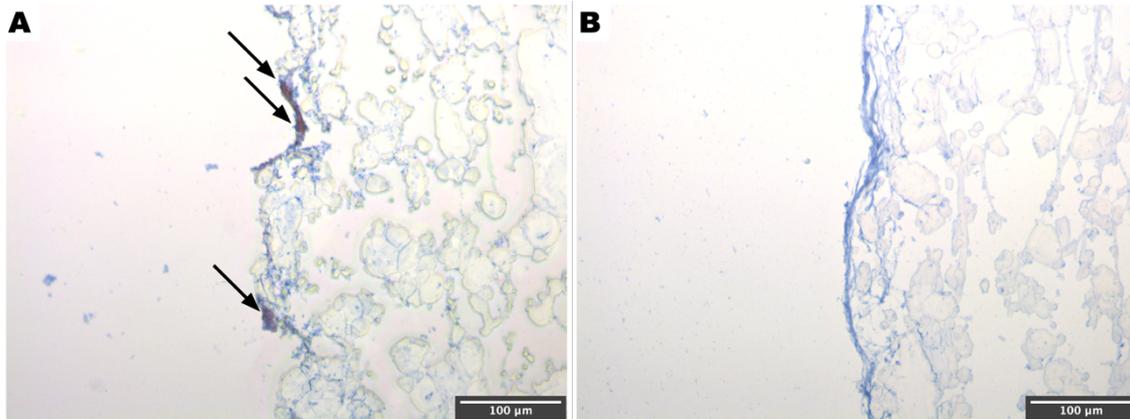


Abbildung 6-11 Gegenüberstellung repräsentativer IHC-Färbungen auf TE-7 an EZM-haltigen Scaffolds nach Dezellularisierung in den Gruppen SD-SDS (A) bzw. SDS-TX (B). Die SD-SDS-Gruppe zeigte sporadisch noch positive Farbsignale und einzelne Zellkerne (Pfeile). Die SDS-TX-Gruppe wies keine Farbreaktion auf.

Die auf der nächsten Seite folgende Tabelle 5 zeigt eine Gegenüberstellung der IHC-Untersuchungsergebnisse der erzeugten Scaffolds, aufgeschlüsselt nach den Gruppen SD-SDS und SDS-TX. Da jeder Gruppe gleichwertige Proben aus denselben Besiedlungsdurchgängen zugrunde lagen, ist ein unmittelbarer Vergleich der Ergebnisse über die Gruppen hinweg möglich. Eine grün hervorgehobene Zelle in der Tabelle bedeutet somit, dass die jeweilige Gruppe mit ihrem Dezellularisierungsprotokoll das bessere Ergebnis bezogen auf den zugrunde liegenden Besiedlungsdurchgang erzielt hat.

Ergebnisse

Tabelle 5 Gegenüberstellung der IHC-Untersuchungsergebnisse der aus FB-besiedelten, EZM-haltigen PU-Patches erzeugten Scaffolds, aufgeschlüsselt nach der Dezellularisierungsgruppe (oben SD/SDS, unten SDS/TX).

SD-SDS	Dezellularisierung	Erhalt der Extrazellulärmatrix				
	TE-7	Fibronectin	Laminin	Elastin	Kollagen I	Kollagen IV
Durchgang 1	+	+	++	+++	0	0
Durchgang 2	+	+	++	+++	0	0
Durchgang 3	+	+++	+++	+++	0	0
Durchgang 4	+	++	++	+++	0	0
Durchgang 5	+	+++	+++	+++	0	0
SDS-TX	TE-7	Fibronectin	Laminin	Elastin	Kollagen I	Kollagen IV
Durchgang 1	0	++	+	++	0	0
Durchgang 2	0	+	+	++	0	0
Durchgang 3	0	++	++	++	0	0
Durchgang 4	0	+	+	+	+	0
Durchgang 5	0	0	++	+	0	0

Die Intensität des Farbsignals dient als Maß der Antigenexpression (0 = kein Farbsignal / + = schwach positiv / ++ = mäßig positiv / +++ = stark positiv). Die Farbkodierung markiert das für den jeweiligen Durchgang führende Protokoll in Hinblick auf die Vollständigkeit der Dezellularisierung bzw. die Schonung der EZM-Bestandteile (gelb = unterlegen / grün = überlegen / weiß = kein Unterschied).

6.2.3 Erfolg der dynamischen Rezellularisierung mit EC

Nachdem die EZM-bedeckten Scaffolds im rotierenden Metallzylinder einer EC-Suspension ausgesetzt worden waren, wurden mittels IHC die EC-Marker CD31 und VE-Cadherin untersucht. Für beide Marker fanden sich einheitlich über die gesamte Probenlänge hinweg in allen Durchgängen lose verteilte, einzelne kreisrunde bis ovale positive Farbsignale mit erkennbaren Zellkernen (exemplarisch CD31 in Abbildung 6-12 A). Diese fanden sich zwar jeweils auf beiden Seiten der Probe; in sieben von zehn SDS-TX-Durchgängen und in allen zehn SD-SDS-Durchgängen überwog die Quantität der Farbsignale auf der EZM-Seite jedoch deutlich. Eine konfluente Oberflächenschicht konnte unabhängig von der jeweils zugrunde liegenden Dezellularisierungsmethode nur über einzelne, kurze Abschnitte hinweg festgestellt werden (Abbildung 6-12 B). Die Farbsignale zeigten sich im Vergleich in der SD-SDS-Gruppe kräftiger ausgeprägt.

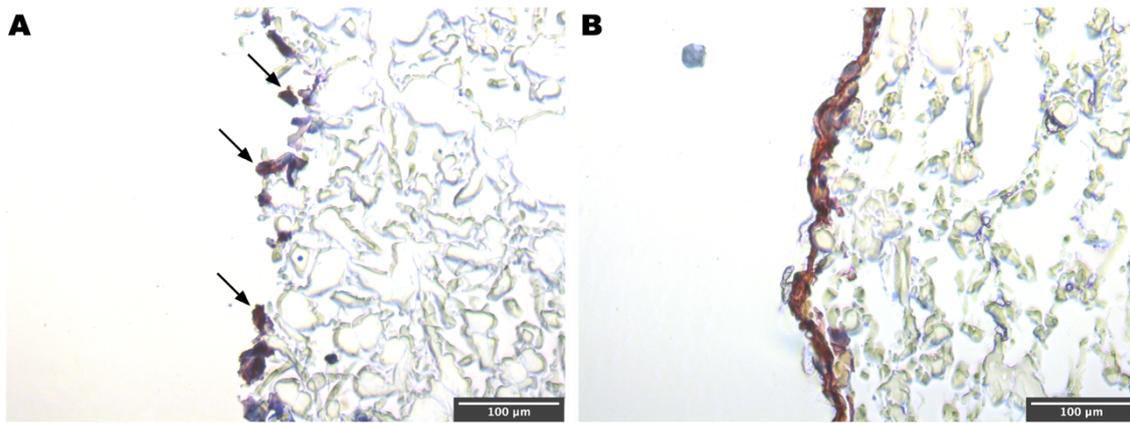


Abbildung 6-12 Repräsentative Zusammenstellung der IHC-Färbungen von EC-exponiertem PU mit AK gegen den EC-Marker CD31 (hier exemplarisch Gruppe SDS-TX): Diskontinuierlich verteilte positive Farbsignale (A) mit abgrenzbaren Zellkernen (Pfeilmarkierungen) fanden sich häufig. Nur vereinzelt fanden sich kurze konfluente Abschnitte (B).

6.2.4 Beschaffenheit der Scaffolds nach Lagerung über 365 Tage

Die erneute IHC-Untersuchung auf EZM-Marker an 365 Tage gelagerten Resten der Scaffolds zeigte für alle Durchgänge beider Gruppen weiterhin positive Farbsignale. Konkret bezieht sich dies auf die EZM-Bestandteile Fibronectin, Laminin und Elastin, die in der Betrachtung nach Dezellularisierung durch (größtenteils stark) positive Ergebnisse aufgefallen waren. Diese Intensität war nach 365 Tagen probenübergreifend leicht rückläufig, das Vorliegen eines positiven Nachweises jedoch weiterhin eindeutig erkennbar.

Die geringste Abweichung vom Ausgangszustand erbrachte die Färbung gegen Fibronectin mit einem weiterhin sehr kräftigen Farbanschlag (Abbildung 6-13 A). Die Färbungen gegen Elastin (Abbildung 6-13 B) und insbesondere Laminin (Abbildung 6-13 C) ließen im Vergleich zur sehr kräftigen Expression vor der Lagerung eine deutliche Abnahme der Intensität erkennen. Im unmittelbaren Vergleich der Dezellularisierungsprotokolle erschien in der SD-SDS-Gruppe der Unterschied zum Zustand unmittelbar nach der Beschichtung weniger stark ausgeprägt. Die Gruppe zeigte bei universell leicht ausgedünnter Oberflächenschicht der Scaffolds die im Vergleich zu SDS-TX höhere erhaltene Schichtdicke. Erneut fiel hier aber auch der bereits in 6.2.2 erwähnte, aufgelockerte und verbreiterte Aspekt der mit SD-SDS behandelten Scaffolds ins Auge. Ein positives TE-7-Signal, wie es unmittelbar nach Dezellularisierung in Patches der SD-SDS-Gruppe noch aufgefallen war, ließ sich nach 365 Tagen in keiner Probe mehr nachweisen (Abbildung 6-13 D).

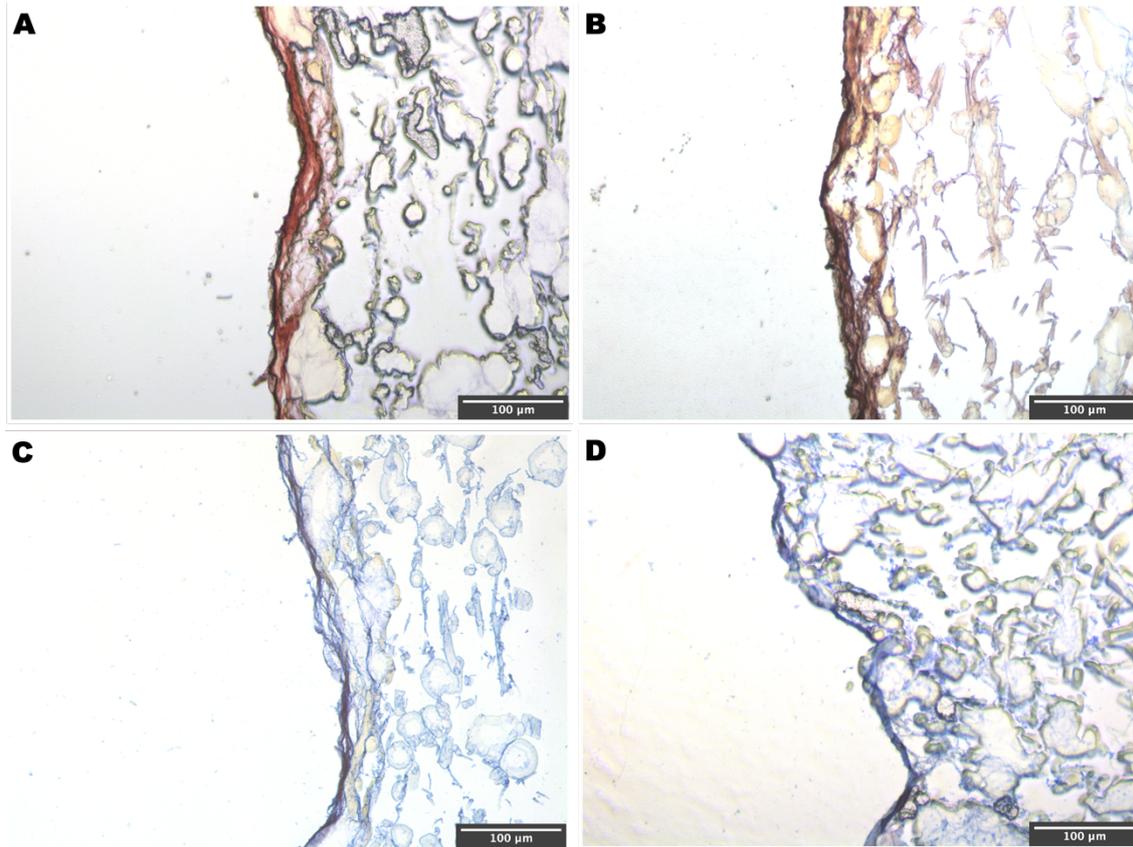


Abbildung 6-13 IHC-Untersuchung von EZM-haltigen Scaffolds nach 365 Tagen: Der weiterhin kräftigen Expression von Fibronectin (A, hier SD-SDS) gegenüber steht ein leichter Rückgang in Intensität und Ausdehnung von Elastin (B, hier SDS-TX). Laminin (C, hier SD-SDS), ein ursprünglich stark positiver Marker, zeigte nach der Lagerung nur noch ein diskretes Farbsignal. Der FB-Marker TE-7 war nach der Lagerung, anders als unmittelbar im Anschluss an die Dezellularisierung, auf den SD-SDS-dezellularisierten Scaffolds nicht mehr nachweisbar (D).

6.2.5 Ergebnis des Aufnähens von Venengrafts

Nach Inkubation der abschließenden Rezellularisierungsversuche (Aufnähen von Venengrafts auf die Scaffolds mit Inkubation über 21 Tage, vgl. 5.5) und Anfertigung von Paraffinschnitten ließen sich in der IHC aller Durchgänge stellenweise FB- und EC-Marker positiv anfärben. Eine Häufung solcher Nachweise fand sich in mittig aus den Proben entnommenen Schnitten, die während der vorausgegangenen Inkubationszeit in unmittelbarem Kontakt mit dem aufgenähten Gefäß gestanden hatten. Randbereiche der Proben zeigten im Vergleich weniger positive Farbsignale. Insbesondere die Färbung gegen den FB-Marker TE-7 brachte vielerorts eindeutige positive Signale mit deutlich abgrenzbaren Zellkernen hervor (Abbildung 6-14 A). Bezüglich dem EC-Marker CD31 zeigten sich nur schwach positive Signale und sehr vereinzelte Kerne (Abbildung 6-14 B).

Ergebnisse

Proben der SD-SDS-Gruppe zeigten in Zusammenschau eine leicht höhere Dichte an positiven Abschnitten als die korrespondierenden Proben der Gruppe SDS-TX.

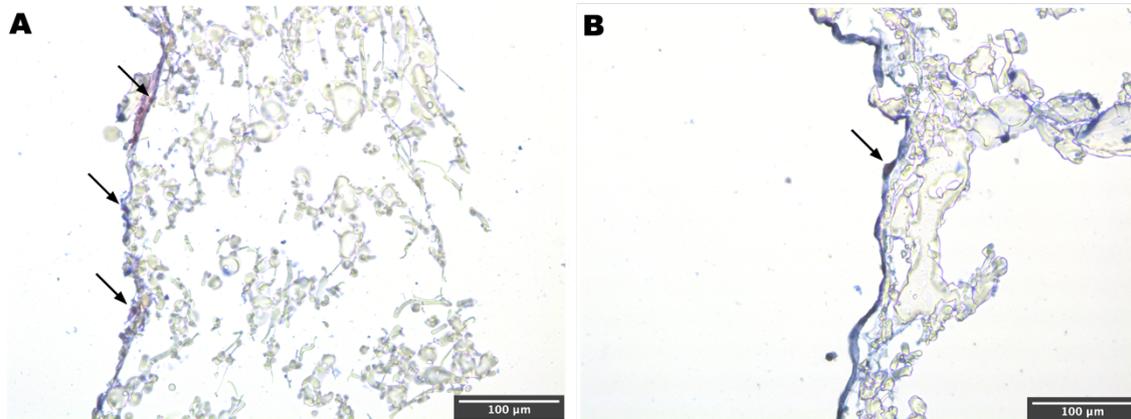


Abbildung 6-14 IHC-Färbung nach dreiwöchiger Inkubation von Venengrafts auf EZM-haltigem PU. Zur Darstellung kamen positive Reaktionen auf TE-7 (A, hier Gruppe SD-SDS) mit immer wieder deutlich abgrenzbaren Zellkernen (Pfeile). CD31 (B, hier Gruppe SDS-TX) zeigte nur grenzwertige Farbsignale mit sehr vereinzelt Zellkernen (Pfeil).

6.3 Zählung verbliebener Zellen nach Besiedelungsversuchen

Bei der Zellzählung (vgl. 5.2.6) nach Ende der Aussaat und Inkubation von FB auf PU waren in 50 ml des resuspendierten Nährmediums in *keinem* der fünf Beschichtungsdurchgänge verbliebene Zellen nachweisbar. Somit konnte von einem vollständigen Anwachsen der ausgesäten Zellen auf der Oberfläche des PU ausgegangen werden.

Die Zellzählung im zentrifugierten Nährmedium nach der dynamischen Rezellularisierung der Scaffolds mit EC über 24 h erbrachte bezogen auf die ursprünglich hinzugegebene Zellzahl $6,1 \pm 4,2 \%$ ($n = 10$) verbliebene Zellen. Der Anteil toter Zellen an dieser im Medium verbliebenen Restmenge konnte mittels Trypan-Blau-Färbung auf $82,3 \pm 18,1 \%$ ($n = 10$) beziffert werden.

6.4 Fluoreszenzmikroskopie vitaler und letaler Zellen

Die zehn Durchgänge des dynamischen Rezellularisierungsversuchs mit EC an jeweils zwei Scaffolds der SD-SDS- und SDS-TX-Gruppe (siehe 5.4) zeigten bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung zahlreiche angewachsene Zellen von mehrheitlich guter Vitalität. Dies galt sowohl für die SD-SDS-Gruppe (Abbildung 6-15 A: PU-Seite // B: EZM-Seite) als auch für die SDS-TX-Gruppe (Abbildung 6-15 C: PU-Seite // D: EZM-Seite). Trotz einer vergleichsweise breiten Streuung der Zellzahlen waren die Farbsignale fast durchweg sehr homogen verteilt und es fanden sich nur vereinzelt Ausreißer in Form schwächer besiedelter Scaffolds oder punktueller „Ballungsgebiete“.

Objektiv erfasst wurden die Ergebnisse durch die automatisierte Quantifizierung der Fluoreszenzsignale in insgesamt 240 repräsentativen Bildaufnahmen der 40 untersuchten Scaffolds: So waren gruppenunabhängig über alle Proben hinweg viele niedergelassene Zellen mit guter Vitalität zu registrieren (463 ± 578 vitale Zellen / Aufnahme im Vergleich zu 201 ± 178 letalen Zellen / Aufnahme). Nur auf einzelnen Bildaufnahmen fanden sich kleine, meist randnahe Probenabschnitte, in denen auf eng umschriebener Fläche die Zahl letaler Zellen gegenüber der Zahl vitaler Zellen überwog.

Insbesondere zeigte die Aufschlüsselung nach Vorder- und Rückseiten der Scaffolds eine deutlich höhere Zahl lebender EC auf der EZM-haltigen Seite (691 ± 727 vitale Zellen / Aufnahme, vgl. Abbildung 6-15 B bzw. D) im Vergleich zur unbeschichteten PU-Seite (234 ± 201 vitale Zellen / Aufnahme, vgl. Abbildung 6-15 A bzw. C). Dieser Unterschied erwies sich mittels t-Test als hoch signifikant ($p < 0,00013$, $\alpha = 0,05$).

Eine signifikante Überlegenheit einer der beiden Dezellularisierungsgruppen konnte dagegen nicht gezeigt werden. Der Vergleich erbrachte hier für die jeweiligen EZM-Seiten der Scaffolds 579 ± 424 (SD-SDS) bzw. 809 ± 934 (SDS-TX) vitale Zellen / Aufnahme ($p > 0,16$).

Ergebnisse

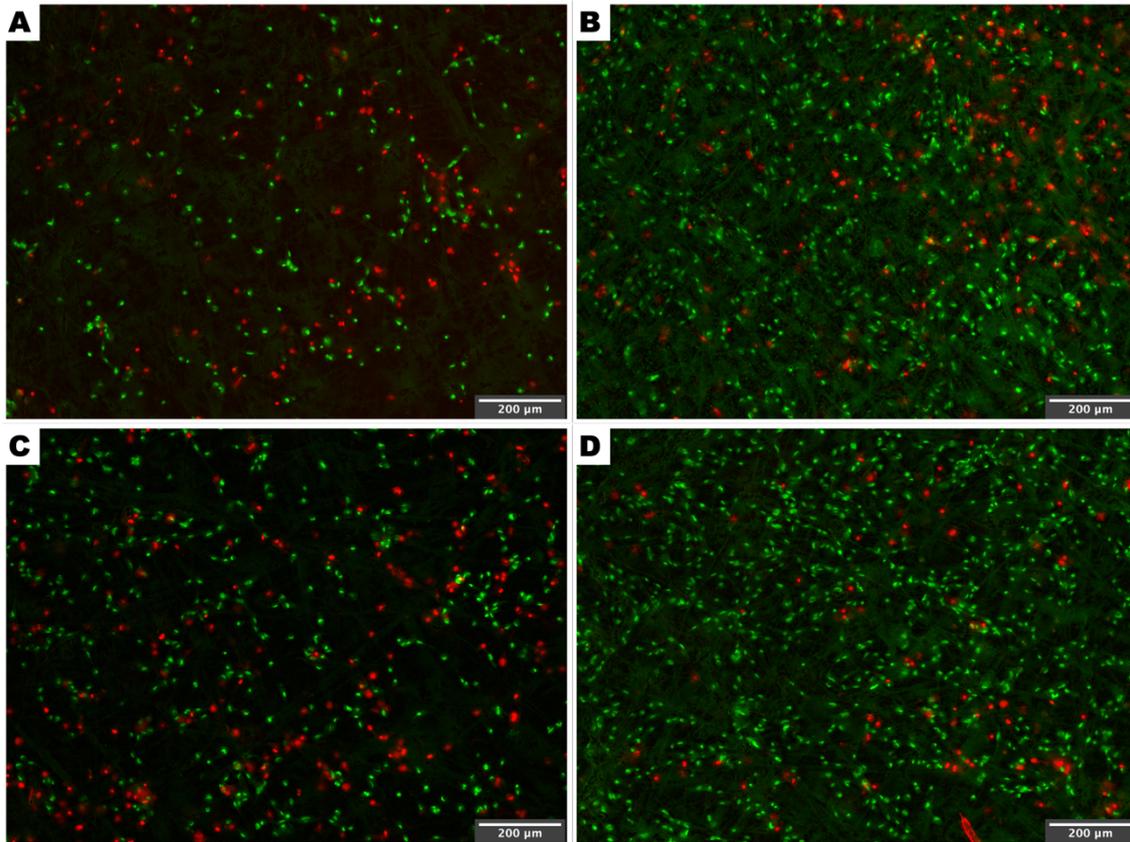


Abbildung 6-15 Repräsentative Auswahl von Vital-Letal-Färbungen nach dynamischer Rezellularisierung von Scaffolds mit EC über 24 h im Rotationszylinder. Rote Punkte entsprechen letalen Zellsignalen, grüne Punkte lebenden Zellen.

Obere Reihe: Zellsignale auf der nicht vorbehandelten Rückseite (A) bzw. EZM-bedeckten Vorderseite (B) eines Scaffolds der Gruppe SD-SDS. Untere Reihe: Zellsignale auf der nicht vorbehandelten Rückseite (C) bzw. EZM-bedeckten Vorderseite (D) eines Scaffolds der Gruppe SDS-TX.

Es zeigt sich eine höhere Zellzahl und -dichte auf den EZM-bedeckten Vorderseiten, bestätigt durch eine computergestützte automatisierte Zellzählung. Im Gruppenvergleich sind vergleichbare Zahlen niedergelassener Zellen mit homogener Verteilung und deutlichem Überwiegen vitaler gegenüber letalen Zellen zu sehen.

7. Diskussion

7.1 Modalitäten bei der Entwicklung biohybrider Scaffolds

Für das aufstrebende kardiovaskuläre TE ist die Auswahl geeigneter Zellträger von zentraler Bedeutung. Als Basis biohybrider Scaffolds sind Kunststoffe wie das biokompatible und bereits vielfach klinisch eingesetzte PU allein schon durch ihre unproblematische Herstellung und prinzipiell unlimitierte Verfügbarkeit sehr attraktiv. Dies unterscheidet sie beispielsweise maßgeblich von Allografts menschlicher Spender. Ethische Spannungsfelder, die mit menschlichen oder tierischen Materialien einhergehen, werden durch die Verwendung synthetischer Werkstoffe ebenfalls weitestgehend vermieden. Kunststoffe verringern auch die Gefahr funktioneller Einbußen durch systemische Inflammation, wie sie beim Einsatz tierischer Xenografts auftreten kann [78]. Ohnehin erweist sich eine suffiziente Dezellularisierung widerstandsfähiger tierischer Grafts als aufwändig. Starnecker et al. identifizierten 2018 in Untersuchungen an Schweineaorten mehrere essentielle Faktoren für vielversprechende Dezellularisierungsprotokolle, beschrieben aber gleichzeitig, dass die Befreiung innen liegender Flächen von Zellen hinter der außen liegender Flächen zurückbleibt [79].

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein biohybrider Ansatz verfolgt. Untersucht werden sollten die Einsatzmöglichkeiten zellfreier regenerativer Materialien auf Basis eines durch Elektrospinning hergestellten aliphatischen PU (Vasomer). Dieses hatte sich als Träger von Zellen des kardiovaskulären Systems bereits in früheren Untersuchungen gegen andere Materialien durchgesetzt und war z. B. als Herzklappenmodell in den Besiedelungs- und Konditionierungsexperimenten von Thierfelder et al. 2013 Aortenklappen-Homografts ebenbürtig gewesen [80, 81].

Mit Blick auf haptische Unterschiede der verwendeten PU-Chargen trotz identischer Fertigungsmodalitäten scheint eine weitere Optimierung der Herstellungsprozesse allerdings lohnend, um bestmöglich reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. In diesem Zusammenhang könnten präzisere Elektrospinning-Techniken zur Erzeugung von PU für biohybride Scaffolds von zunehmender Bedeutung sein.

Diskussion

Gelingt die weitere Annäherung an die mechanischen Eigenschaften nativer Gewebe, erweitern sich die potenziellen Einsatzgebiete z. B. um die Erzeugung kleinlumiger Gefäßprothesen für Bypass-Operationen an Patienten mit koronarer Herzerkrankung [82-84]. Die vorgelegte Untersuchung konzentriert sich indes auf Patches: Diesen wird gegenüber komplexeren Gebilden wie Herzklappen oder Gefäßen ein früherer Einzug in die regelhafte klinische Anwendung zugetraut – z. B. zur Versorgung atrialer oder ventrikulärer Septumdefekte [51].

Verfügbare Zellquellen und das Für und Wider ihres Einsatzes im kardiovaskulären TE wurden bereits dargelegt (3.5). Als Grundlage der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenschau aller Faktoren frühere Untersuchungen von Schäfermeier et al. herangezogen. Dementsprechend wurden FB und EC aus der Vena saphena magna erwachsener Patienten isoliert, die in der Herzchirurgischen Klinik der LMU herzchirurgischen Eingriffen unterzogen worden waren [85].

Ob ein biohybrider Scaffold das Potenzial hat in die klinische Praxis Einzug zu halten, hängt nicht zuletzt maßgeblich von ökonomischen Gesichtspunkten ab. Entscheidend ist diesbezüglich vor allem, ob eine zuverlässig reproduzierbare Erzeugung und die Eignung für eine längerfristige Lagerung gewährleistet sind. Erst diese Eigenschaften ermöglichen über die Herstellung großer Stückzahlen auf Vorrat einen so genannten „Off-the-shelf“-Einsatz und sind Voraussetzung für die Kosteneffizienz einer neu entwickelten Prothese. Die Investition in (teil-) automatisierte Verfahren würde dann Produktionsvolumina ermöglichen, die ein Vielfaches über den Möglichkeiten der manuellen Herstellung liegen. Gleichzeitig würde durch Skalierungseffekte der pro hergestellter Prothese betriebene Aufwand an Material und Arbeitskraft im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung erheblich sinken. Ein durch geeignete Modifikationen flexibler Einsatz der entwickelten Prothese auch in anderen Teilbereichen der Medizin könnte zusätzliche Anwendungsgebiete erschließen und die Wirtschaftlichkeit weiter verbessern. Sollten zudem der Transport und die Lagerung bis zum Einsatz am Patienten mit Hilfe bereits vorhandener Infrastruktur ohne teure Neuanschaffungen gelingen, wäre das Produkt wirtschaftlich überaus attraktiv.

Diskussion

Auch aus der praktischen Perspektive des klinisch tätigen Arztes wäre ein „Off-the-shelf“-Einsatz Tissue-engineerter Prothesen ein enormer Vorteil, da eine Implantation im Bedarfsfall unverzüglich und ohne nennenswerten organisatorischen Aufwand erfolgen könnte. Dies unterstreicht wiederum auch die Bedeutung von empfängerunabhängigen Zellquellen zur EZM-Bildung: Schließlich sollten gerade auch Notfallpatienten mit dringlicher Indikation zur operativen Versorgung moderne Prothesen erhalten können, für die ein längerer Vorlauf zur Fertigung individueller Medizinprodukte nicht in Frage kommt.

Die Vorteile einer Prothese, die weder menschliche noch tierische Komponenten enthält, liegen auch mit Blick auf die zwangsläufig zu klärende Zulassungsfrage auf der Hand. Ein neutrales Produkt kann deutlich einfacher auf dem Markt platziert werden als eine Prothese mit kritischen Bestandteilen wie Zellen oder biologischen Wachstumsfaktoren. Solche Bestandteile könnten durch die anzunehmende immunologische Wirkung eine Einstufung als Arzneimittel mit der Notwendigkeit aufwändiger Zulassungsstudien nach sich ziehen. Kann man die Prothese dagegen als biologisch neutralen Stoff betrachten, der steril und biokompatibel ist, wäre nach einer wissenschaftlichen Überprüfung und Zertifizierung im Sinne der 2021 in Kraft getretenen europäischen Medizinprodukte-Verordnung (Medical Device Regulation, MDR) eine weitaus weniger komplexe Zulassung als Medizinprodukt der Klasse III denkbar.

Rein synthetische Ansätze zur Herstellung geeigneter Prothesen für das TE schließlich werden zwar ebenfalls untersucht, so z. B. kürzlich von Guo et al. in Form einer „künstlichen EZM“ mit Imitation von Kollagenfibrillen [86]. Fraglich bleibt aber, ob solche Materialien ausreichend attraktiv für die Zellmigration sind, um sich als ernsthafte Alternative zu etablieren. Aussagekräftige Untersuchungen zur Sicherheit und Handhabung solcher Produkte liegen ebenfalls noch nicht vor. Somit verdient die Entwicklung von Scaffolds auf Spenderzellbasis und damit die Etablierung schonender und gründlicher Dezellularisierungsprotokolle weiter unverminderte Aufmerksamkeit.

7.2 Qualität und Nebenfunde der EZM-Herstellung

Um PU für Scaffolds im TE nutzbar zu machen sind Oberflächenmodifikationen erforderlich. Ableiten lässt sich dies aus In-vitro-Untersuchungen, in denen menschliche EC aus der V. saphena magna auf kommerziell verfügbarem, nativem PU eine reduzierte mitochondriale Aktivität und fehlende Zellproliferation zeigen [87]. Dies deckt sich mit der Beobachtung signifikant niedrigerer Zellzahlen auf der PU-Seite der in dieser Arbeit vorgestellten Scaffolds im Rezellularisierungsversuch mit EC. Als Modifikation bietet sich eine von menschlichen FB sezernierte EZM an. Diese kann prinzipiell auch als alleiniger biologischer Scaffold ohne künstliches Gerüst dem vaskulären TE zugrunde gelegt werden, wie beispielsweise Bourget et al. zeigten [88]. Die in der genannten Untersuchung erfolgte Weiterverarbeitung zu einer künstlichen Gefäßmedia durch Besiedelung mit glatten Muskelzellen aus Nabelschnurgefäßen erhöht den zeitlichen und materiellen Aufwand allerdings beträchtlich und erscheint daher weniger attraktiv als die flexible Verwendbarkeit eines geeigneten Kunststoffes, wie er in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Auf der Grundlage etablierter Protokolle, wie sie bei Aleksieva et al. 2012 beschrieben wurden, konnten in der hier diskutierten Untersuchung aus Venengrafts problemlos FB- und EC-Reinkulturen mit guten Wachstumseigenschaften in ausreichender Zahl herangezüchtet werden [89]. Die Bildung einer konfluenten EZM gelang mit Aussaat einer FB-Zahl von $7,5 \times 10^5/\text{cm}^2$ und Inkubation über 10 Tage auch auf größeren PU-Flächen um 100 cm^2 reproduzierbar. Dies belegte die Darstellung homogener Oberflächenschichten mittels REM und IHC, wobei typische FB- und EZM-Marker sowohl mittig als auch randständig auf der untersuchten Fläche nachgewiesen werden konnten. Die Erzeugung konfluenter und gleichförmiger Zellschichten, die von König et al. 2016 mit einem komplexen Versuchsaufbau im Bioreaktor für ca. 60 cm^2 messende biohybride Aortenklappen mit ebenfalls $7,5 \times 10^5/\text{cm}^2$ FB gezeigt wurde, lässt sich somit bei Besiedelung ebener Materialien auf größere Oberflächen ausweiten [43].

Auffällig war die Verminderung der initialen FB-Zelldichte und späteren EZM-Homogenität sowie -Haltbarkeit auf den Proben eines Versuchsdurchgangs, der bei der REM-Betrachtung das Wachstum stäbchenförmiger, nicht weiter differenzierbarer Bakterien zeigte. Dieser Befund passt zu Erkenntnissen, die für

Diskussion

grampositive und -negative Erreger eine Adhärenz an EZM-Bestandteile wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin mittels spezifischer Bindeproteine beschreiben, in deren Folge strukturelle Veränderungen auftreten. Diesbezüglich relevante Pathogenitätsfaktoren und Abwehrmechanismen werden sogar bei der Entwicklung neuartiger Antiinfektiva untersucht [90-92].

Die in zwei von fünf Durchgängen der FB-Besiedelungsversuche aufgefallenen Zellkonglomerate sind mutmaßlich von der hohen ausgebrachten Zellzahl und -dichte begünstigt. Mit ursächlich könnte das Alter der Patienten sein, von denen die verwendeten FB gewonnen wurden: Nach Drubaix et al. ist der Anteil von FB-Wachstumsfaktoren in venösen Gefäßen beim alten Menschen rückläufig. Dies begünstige über eine veränderte Zusammensetzung der EZM Gefäßerkrankungen und gehe in der Zellkultur betagter Spender mit morphologischen Veränderungen hin zu polygonalen mehrkernigen Zellen einher [93]. Unklar blieb in der vorliegenden Untersuchung die genaue Differenzierung der auffälligen Zellen, da bei ihnen keine Expression FB- oder EC-typischer Marker gezeigt werden konnte. Betrachtet man den isoliert stark positiven Nachweis von Laminin und die mikroskopische Morphologie, fühlt man sich an die beschriebene Rolle von EZM-Bestandteilen bei Zellentartung, Neoangiogenese und Tumorausbreitung erinnert [94-97]. Die beim Glioblastom im Mausmodell untersuchte Blockierung einer Laminin-Achse mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung bewirkte z. B. bei Sun et al. 2019 ein vermindertes Tumorwachstum mit verlängertem Überleben [98].

Positiv hervorzuheben ist, dass die Aussaat von EC und das Auswachsen von Zellen aus aufgenähten Venengrafts in den durchgeführten Versuchen in beiden Gruppen und über alle Versuchsdurchgänge hinweg erfolgreich verlief. Selbst auf der geschädigten EZM des kontaminierten Besiedelungsdurchgangs gelang dies, wenn auch langsamer. Dies passt zu Beobachtungen von Krüger-Genge et al. und Li et al., die innerhalb der EZM insbesondere Laminine als Grundlage für stabile EC-Monolayer herausstellen [99, 100]. Diese EZM-Bestandteile waren in allen vorliegenden Proben wenig bis gar nicht kompromittiert. Eine direkte Korrelation mit dem Nachweis von *Fibronectin* war indes nicht festzustellen, obwohl dessen Wechselwirkung mit apikalen Oberflächenstrukturen vaskulärer EC bei der Bildung konfluenter EC-Monolayer 1985 von Kramer besonders betont wurde [101].

Mit Blick auf schwankende Ergebnisse bei der Rezellularisierung mit EC erscheinen Beobachtungen von Madri et al. interessant: Erodierende Verletzungen mit Veränderungen der EZM-Zusammensetzung und -Struktur können demnach über zelluläre und humorale Signalmechanismen zum Auftreten „dysfunktionaler“ Phänotypen insbesondere mikrovaskulärer EC führen [102]. Ein Abfall bei der Endothelialisierbarkeit stärker degradiertes Scaffolds, wie z. B. im bakteriell kontaminierten Durchgang, erscheint so erklärbar.

Für die bestmögliche EZM-Qualität und Endothelialisierbarkeit sowie eine sichere Anwendbarkeit von Scaffolds erscheint ein aseptischer Workflow unabdingbar, zumal sich bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien gezielt gegen EC richten und Kunststoffimplantate ein häufiger klinischer Infektfokus sind [103, 104]. Zwar werden zahlreiche Materialmodifikationen zur Prophylaxe infektiologisch relevanter Biofilme erforscht, z. B. in Gestalt von Titan-Nanoröhren mit Chitosan und dem Antibiotikum Gentamicin, als Metalllegierungen oder in Form von Silber-Nanopartikeln [105-107]. Für den in dieser Arbeit verfolgten Ansatz scheinen diese Anpassungen wegen des vielfältigen Potenzials toxischer Einwirkungen auf EC aber weniger geeignet [108, 109]. Ein abschließendes Sterilisationsverfahren hingegen könnte nach Matsuka et al. im Anschluss an die Dezellularisierung hilfreich sein: Zwar scheinen Gammabestrahlung oder Ethylenoxid über ausgeprägte strukturelle, biomechanische und chemische Schäden am Scaffold die Zelladhäsion auf einer EZM zu verschlechtern. Im Vergleich dazu traten aber bei Behandlung mit Peroxyessigsäure nur begrenzte Veränderungen auf, darunter sogar für die spätere Zellniederlassung günstige chemische Effekte wie Hydroxylierung und zunehmende Oberflächen-Hydrophilie [110]. Die Hinzunahme derartiger Sterilisationsschritte zu einer allgemein streng aseptischen Verarbeitungskette sollte erprobt werden.

7.3 Erkenntnisse nach Dezellularisierung

Seit Jahren bemüht sich das kardiovaskuläre TE darum, traditionelle Ansätze durch schonende und effektive Dezellularisierungsschritte zu erweitern. Ziel ist die Produktion von „gebrauchsfertigen“ regenerativen / biohybriden Medizinprodukten mit der Möglichkeit einer Vorratshaltung im klinischen Alltag [19].

Diskussion

Da für das genannte Ziel eine vollständige Dezellularisierung bei gleichzeitiger Schonung der EZM erforderlich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Grundlage interner Voruntersuchungen ein Protokoll aus SD + SDS mit einem aus SDS + TX verglichen (vgl. 3.7). Protokoll A bestand aus 0,5 % SD / 0,5 % SDS, wie z. B. über 24 h von Della Barbera et al. erfolgreich zur Erzeugung dezellularisierter Aorten- und Pulmonalhomografts im Schaf getestet [111]. Es wurde angesichts der geringen Dicke des in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsmaterials nur über 16 h eingesetzt. Für den gleichen Zeitraum kamen bei Protokoll B 0,5 % SDS zum Einsatz, gefolgt von 0,5 % TX für 0,5 h. TX soll laut einer Übersichtsarbeit von Crapo et al. vor allem bei dünnen Materialien gute Resultate liefern, zu denen auch das in dieser Arbeit verwendete PU zählt [112]. Die Kombination mit SDS sollte Hinweisen auf einen unzureichenden Dezellularisierungserfolg bei alleiniger TX-Anwendung Rechnung tragen, wie sie sich z. B. bei In-vitro-Versuchen von Simsa et al. 2018 mit dezellularisierten Hohlvenen des Schweins fanden. Dort wurde bei ausschließlichem Einsatz von TX nur eine Lyse von Zellen ohne vollständige Entfernung der DNS beschrieben [113].

Auf enzymatische Komponenten wie eine DNase, die in der letztgenannten Veröffentlichung als günstig für die spätere Endothelialisierung bewertet wurde, verzichtete der hier vorgelegte Aufbau: Enzyme hatten in früheren laborinternen Versuchen bei ausreichend langer Inkubationszeit deutliche Schäden an der EZM induziert, was sich mit Beobachtungen z. B. von Schenke-Layland et al. deckt [114].

Ergänzt wurden beide Protokolle um Wachschriffe in PBS über 6 x 24 h mit dem Ziel einer vollständigen Auswaschung insbesondere des zytotoxischen SDS. Für dieses ist durch Kawazoye et al. eine für die hier beabsichtigten Zwecke kontraproduktive, hohe Bindungsfreudigkeit an elastische Fasern beschrieben worden [115].

Beim Vergleich der Ergebnisse der Dezellularisierungsprotokolle ist eine gewisse Einschränkung der Aussagekraft einzuräumen: Durch die Folgeversuche lag keine ausreichende Materialmenge für den wünschenswerten DNS-Nachweis z. B. mittels einer hierfür etablierten DAPI-Färbung vor [116]. Die IHC-Kombination von spezifischen AK-Nachweisen und Hämalanfärbung bot allerdings einen guten Anhaltspunkt für den Verbleib von Zell- und Kernstrukturen.

Diskussion

In den vorgenommenen Versuchen zeigten keine der mit SDS-TX behandelten Proben Zeichen verbliebener Zellstrukturen in REM und IHC. Unerwartet war der Restnachweis von Zellkernen und dem FB-Marker TE-7 in allen fünf Durchgängen des eigentlich als aggressiver eingeschätzten Protokolls SD-SDS. Vor allem Scaffolds dieser Gruppe hatten zuvor interessanterweise die Tendenz gezeigt, während der Dezellularisierung an der Innenwand der Aufbewahrungsgefäße aus PP anzuhafte. Die Ursache hierfür bleibt unklar; die daraus folgende schlechtere Umspülung der Patches könnte jedoch schon früh eine weniger gründliche Dezellularisierung begünstigt und damit einen Circulus vitiosus bei der Zellentfernung befördert haben: Die Adhäsion von Zellen auf PP ist ein bekanntes Phänomen, dem Gruppen wie Chen et al. durch Zwitterionisierung von Oberflächen zu begegnen versuchten [117]. Auch in der Hernienchirurgie werden spezielle Beschichtungen als Antwort auf die adhäsiven Eigenschaften von PP erforscht, da PP-Transplantate postoperativ zu problematischen Verwachsungen führen können [118].

Eine vorübergehend unterbrochene Umspülung mit der Dezellularisierungs- bzw. Waschlösung ist zugleich ein möglicher Grund für den Verbleib von Zellbestandteilen auf den Proben und die gegenüber SDS-TX geringfügig besser erhaltene Expression von EZM-Markern in der IHC. Auf Scaffolds der Gruppe SD-SDS legte die IHC durch höhere Schichtdicke von Farbsignalen vor allem bei den Färbungen gegen Laminin und Elastin auch einen besseren EZM-Erhalt nahe. Neben einer tatsächlichen Überlegenheit der Methode sollten diesbezüglich aber auch die genannten adhäsionsbedingten Störungen und mögliche elektrostatische Effekte diskutiert werden: Die Bindung der amphipatischen Detergenzien SD und SDS an EZM-Proteine über ihre hydrophoben Abschnitte führt zur Freilegung hydrophiler Regionen, was die Einlagerung von Flüssigkeit und damit ein Aufquellen der Scaffolds begünstigen kann. Courtman et al. beschrieben dies 1994 ausgeprägt für das stark ionische SDS und beobachteten dabei eine Abnahme der Stabilität von Kollagen [119]. Es erscheint denkbar, dass diese Effekte bei Kombination zweier ionischer Detergenzien wie in dem hier verwendeten Protokoll noch zunehmen. Tatsächlich schwankten Struktur und Breite der einheitlich hergestellten Scaffolds in der lichtmikroskopischen Betrachtung der gewonnenen Proben, wobei SD-SDS gegenüber der Vergleichsgruppe eine Auflockerungstendenz zeigte. Auch war die

Expression insbesondere von Kollagen-Markern bei den IHC-Färbungen deutlich stärker rückläufig als die der anderen untersuchten EZM-Teile.

In der REM dagegen ließ sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den Proben der Protokolle zeigen: Beide gingen in den jeweils vier nicht mikrobiell kontaminierten Ansätzen mit dem Erhalt einer konfluenten, homogenen EZM einher.

7.4 Rezellularisierbarkeit der biohybriden Scaffolds

Die Zellzählungen im Rest-Medium der Rezellularisierung mit EC im rotierenden Beschichtungszyylinder ließen den Schluss zu, dass sich der weit überwiegende Teil der eingebrachten Zellen auf den biohybriden Scaffolds niedergelassen hatte. Die gegenüber statischen Ansätzen signifikant bessere Re-Zellularisierbarkeit (und auch EZM-Nachbildung) bei dynamischer Inkubation mit moderatem Fluss wurde u. a. bereits von Schenke-Layland et al. und Lichtenberg et al. gezeigt [120, 121].

Die in der vorgelegten Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten weiterhin, dass EC die EZM-Oberfläche im unmittelbaren Vergleich mit dem unbehandelten PU der Scaffold-Rückseiten bevorzugten. Dies steht in Übereinklang mit früheren Untersuchungen, die EZM-bedecktem PU deutlich überlegene EC-Anwachsraten gegenüber dem nativen Material bescheinigten [122]. Dass prinzipiell auch natives PU das Anwachsen von EC mit Einschränkungen ermöglicht, ist aus vergleichenden Studien zu Oberflächenmodifikationen bekannt, die eine Verbesserung der In-vitro- und In-situ-Endothelialisierung von PU zum Ziel hatten [123, 124].

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Re-Zellularisierbarkeit in Abhängigkeit vom zuvor verwendeten Dezellularisierungsprotokoll war in der vorgelegten Versuchsreihe trotz eines großen Probenumfangs (n = 10 mit jeweils zwei Patches pro Protokoll) nicht festzustellen. Die Aussagekraft der statistischen Tests an den Vital-Letal-Färbungen der Rezellularisierung ist allerdings leicht eingeschränkt wegen Unebenheiten der vielfach verarbeiteten Proben und daraus folgenden Artefakten bei der Fluoreszenzmikroskopie, die der automatisierten (und damit ebenfalls störanfälligen) Quantifizierung der Zellsignale zugrunde liegt.

Diskussion

Mittels IHC konnten zwar auf allen Proben EC-Marker nachgewiesen werden. Die variable und lockere Verteilung der Zellen machte es aber unmöglich, die Erkenntnisse der in gleichmäßigen Abständen gewählten Schnittebenen als repräsentativ für die gesamten Proben zu verallgemeinern. Die REM wiederum, die die gesamte Oberfläche der Patches betrachten konnte, zeigte auf der EZM-Seite in allen Ansätzen ohne Bakterienkontakt gruppenübergreifend Monolayer mit beginnendem Pflastersteinaspekt, was nach gängiger Auslegung charakteristisch für ein flächiges EC-Wachstum ist [125].

Auch die über 21 Tage mit venösen Gefäßen kombinierten Scaffolds zeigten in der REM-Betrachtung auf Proben aller fünf Ansätze regional ein homogenes, sich ausbreitendes Pflastersteinrelief, das in Zusammenschau mit positiven IHC-Nachweisen von CD31 und VE-Cadherin als Ausdruck eines umschriebenen konfluenten Bewuchses mit EC gewertet werden kann. FB-typische Strukturen waren zahlreich in REM und IHC nachweisbar. Angesichts der wenig unterschiedlichen REM-Befunde kann auch hier keine Überlegenheit eines der beiden Dezellularisierungsprotokolle gezeigt werden.

Selbst teilweise degradierte EZM geht den Ergebnissen zufolge mit einer guten Rezellularisierbarkeit einher. Dies zeigte nicht nur die dynamische EC-Exposition der bakterienkontaminierten Patches mit niedriger EZM-Qualität. Auch die aus Gründen der Materialverfügbarkeit mit Venengrafts angesetzten statischen Rezellularisierungsversuche zeigten beeindruckende Ergebnisse, obwohl über 365 Tage gelagerte Patches mit beginnenden Degradationszeichen als Zellträger dienten. Diese Beobachtung wird z. B. von Grauss et al. gestützt: Sie beschrieben 2005 das Potenzial ausgesäter EC, auch unter herausfordernden Bedingungen anzuwachsen und verlorene EZM-Bestandteile neu zu bilden [66].

Die erzeugten Scaffolds mit *arteriellen* statt venösen Gefäßen zu verknüpfen, könnte die Ergebnisse womöglich weiter verbessern: Bei Geenen et al. waren bei vergleichbarer Proliferation arterielle EC des Schweins solchen aus venösen Gefäßen hinsichtlich der Tiefe ihrer Auswanderung und der Adhäsion auf Kollagen nach Scherbeanspruchung überlegen [126].

Längerfristig könnten auch Bemühungen um die künstliche Beschleunigung der In-vivo-Endothelialisierung biohybrider Scaffolds an Relevanz gewinnen. Bisher steht dem eine erhebliche Komplikationsrate entgegen, so z. B. bei der klinischen Anwendung monoklonaler Antikörper in Stents, die bei Patienten mit ST-Hebungs-Myokardinfarkt endotheliale Vorläuferzellen rekrutieren sollten [127, 128].

Im Übrigen soll der Stellenwert von Tierversuchen nicht ausgeklammert werden. Trotz ethisch strittiger Punkte erscheinen diese als Zwischenschritt zur Einschätzung von In-vivo-Endothelialisierbarkeit und Biokompatibilität eines Scaffolds bis auf Weiteres noch nicht verzichtbar. Vielversprechende Studien legten z. B. Syedain et al. mit biohybriden Aortenklappen über 24 Wochen im Schafmodell vor, ebenso Weber et al. mit biohybriden Pulmonalklappen über acht Wochen im Primaten [129, 130]. Ob der in dieser Arbeit vorgestellte Scaffold sich unter derartigen Bedingungen ebenfalls beweisen kann, bleibt noch zu untersuchen.

7.5 Haltbarkeit und Reproduzierbarkeit der biohybriden Scaffolds

Kardiovaskuläre Prothesen müssen im Blutkreislauf erheblichen Belastungen standhalten, ohne Undichtigkeiten oder aneurysmatische Aussackungen zu entwickeln, und müssen zur Vermeidung maligner Herzrhythmusstörungen eine zuverlässige elektrische Leitfähigkeit gewährleisten [14, 51, 131-134].

Polyurethan bringt alle geforderten Voraussetzungen mit. Aus den langjährigen Erfahrungen mit dem Werkstoff im medizinischen Bereich ist jedoch bekannt, dass auch die Biostabilität seiner weit entwickelten aliphatischen Formen ihre Grenzen hat. Eine beschriebene Veränderung ist z. B. die In-vitro-Kalzifizierung [135, 136]. Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, dass Veränderungen der PU-Komponente relevante Limitationen für die Einsetzbarkeit eines Tissue-engineerten Scaffolds mit sich bringen: Untersuchungen von Seifalian et al. zur Biostabilität vaskulärer PU-Grafts etwa konnten nach guten Ergebnissen in vitro auch über lange Zeiträume in vivo in Hunden überzeugen. Histologisch, in der REM sowie bei mechanischen Testungen waren bis zu drei Jahre nach Implantation keine Zeichen einer relevanten Degradation festzustellen [137].

Diskussion

Es gibt sogar Berichte über die Entwicklung besonderer Arten von PU, deren biokompatible und kontrollierte Degradation als Bestandteil von Scaffolds die Assimilation und Geweberegeneration im Körper unterstützen soll [138, 139].

Somit gilt ein besonderes Augenmerk bei der Frage nach langfristiger Haltbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen biohybriden Scaffolds ihrer EZM-Komponente. Diese wurde nach steriler Lagerung bei 4 °C über 365 Tage in PBS erneut untersucht. Die Expression von EZM-Markern in der IHC nach zwölfmonatiger Lagerung zeigte eine rückläufige Tendenz (am deutlichsten im Vergleich zum Ausgangszustand bei Laminin und Elastin, am geringsten bei Fibronectin). Passend dazu war in der REM in höheren Vergrößerungen eine – allerdings nur leichte – Lockerung der insgesamt gut erhaltenen EZM-Decke mit punktueller Freilegung von PU-Fasern zu erkennen.

In Zusammenschau mit dem positiven Ergebnis der dynamischen EC-Inkubation sprechen die genannten Befunde für eine gute Stabilität und Haltbarkeit des biohybriden Scaffolds, der damit sehr geeignet für die beabsichtigten Zwecke erscheint. Insbesondere waren die im Rahmen der manuellen Einnahm in die Teflonhalterung wirkenden Kräfte der Integrität der Scaffolds nicht so abträglich, dass die anschließende Re-Endothelialisierung darunter gelitten hätte.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass der nach Dezellularisierung in der IHC angedeutete Verlust von Kollagenstrukturen analog der Rolle in biologischen Geweben Einfluss auf die mechanische Stabilität des Scaffolds in vivo hat [140]. Um weitere belastbarere Erkenntnisse zur Eignung des neu entwickelten Scaffolds für den „Off-the-shelf“-Einsatz im klinischen Alltag zu gewinnen, sollten daher zusätzliche biomechanische Tests erfolgen. Derartige Untersuchungen an dezellularisierten Allografts oder tierischen Materialien zeigten in der Literatur signifikante Einbußen bei Zugbelastbarkeit oder Elastizität nach mehr als zwölfmonatiger Lagerung, weshalb vorbeugende Maßnahmen wie Gefriertrocknung in Erprobung sind [141-144]. Die PU-Komponente der hier vorgestellten Scaffolds sollte ihre Anfälligkeit für derartige Probleme allerdings von vorneherein deutlich reduzieren.

Diskussion

Abschließend ist zu betonen, dass die gesammelten Ergebnisse schon in dieser frühen Phase der Entwicklung bei aufwandsbedingt noch überschaubarem Probenumfang eine gute Reproduzierbarkeit der Scaffold-eigenschaften und -haltbarkeit zeigen. Dies bestätigte sich selbst unter teilweise widrigen Rahmenbedingungen bei der manuellen Herstellung. Damit ist eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen zur Weiterentwicklung des Ansatzes in ein massenproduzierbares „Off-the-shelf“-Serienprodukt gegeben. Die Ergänzung der diskutierten weitergehenden Untersuchungen erscheint dementsprechend lohnend: Bestätigen diese die bisherigen positiven Befunde, könnten in einem nächsten Schritt verfeinerte und automatisierte Herstellungsverfahren dem vorgestellten biohybriden Scaffold den Einzug als Medizinprodukt in den klinischen Alltag ebnen.

8. Zusammenfassung

Biokompatible Zellträger auf Basis synthetischer Materialien sind ein äußerst vielversprechender Ansatz, mit dem das kardiovaskuläre TE moderne und sichere Implantate für den klinischen Einsatz entwickelt. Hierfür wurde in dieser Arbeit mithilfe von humanen FB und zwei effektiven sowie schonenden Dezellularisierungsprotokollen ein biohybrider PU-Scaffold in Patch-Form erfolgreich und reproduzierbar hergestellt. Dieser könnte mit seiner Beschaffenheit beispielsweise für die operative Versorgung atrialer und ventrikulärer Septumdefekte in Betracht kommen.

Der Scaffold wurde auf Eigenschaften hin untersucht, die für eine Anwendbarkeit *in vivo* besonders bedeutsam erschienen, und zeigte dabei großes Potenzial: So konnte eine sehr gute Re-Zellularisierbarkeit bei dynamischer Inkubation frischer Scaffolds mit EC gezeigt werden, die der Zellularisierbarkeit von unbehandeltem PU in den angefertigten Messungen hoch signifikant überlegen war. Trotz geringer Einbußen bei der Qualität der Oberflächenschicht nach 365 Tagen Lagerung ist zudem auch nach diesem langen Zeitraum noch ein homogenes Bewachsen der Scaffoldfläche durch FB und EC aus aufgenähten humanen Venengrafts gelungen, bis hin zur Ausbildung konfluenter homogener Deckschichten. Dies spricht für eine gute Eignung des Scaffolds für einen perspektivischen „Off-the-shelf“-Gebrauch – ein entscheidendes Kriterium, um Patienten in der klinischen Praxis unter zeitkritischen Bedingungen tatsächlich mit einem innovativen Implantat versorgen zu können. Weitergehende Untersuchungen mit arteriellen Blutgefäßen und *In-vivo*-Versuche im Tiermodell sollten diese vielversprechenden Ergebnisse überprüfen und erweitern. Schon jetzt zeigt der untersuchte Ansatz eindrucksvoll sein Potenzial für einen möglichen späteren Einsatz am Patienten.

Die entwickelten Scaffolds zeigten sich außergewöhnlich robust im Angesicht mechanischer Manipulationen, denen sie bei den Versuchsreihen ausgesetzt waren. Dies ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium angesichts der fordernden Verhältnisse im beabsichtigten Einsatzgebiet, dem Blutkreislauf. Zur Objektivierung der beobachteten Stabilität erscheint die Ergänzung biomechanischer Tests lohnend.

Zusammenfassung

In dem hier vorgestellten frühen Entwicklungsstadium zeigten sich noch zu erwartende Schwachpunkte wie ein vergleichsweise aufwändiges Herstellungsverfahren und eine gewisse Anfälligkeit gegenüber Mikroorganismen. Gleichzeitig bestehen zahlreiche Optimierungschancen, u. a. durch Innovationen auf dem Gebiet des Elektrosinnings, vermehrte Automatisierung und geeignete Verfahrensmodifikationen (beispielsweise in Form von Sterilisationsschritten). Dahingehende weitere Untersuchungen empfehlen sich unbedingt, da die vorliegenden Ergebnisse für eine außergewöhnlich gute Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit und damit ein großes Potenzial des entwickelten Scaffolds sprechen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse ist die Entwicklung eines robusten, haltbaren und in vitro vielseitig rezellularisierbaren biohybriden Scaffolds gelungen, dessen Konstruktionsprinzip in Zukunft die Basis für eine vielfältig nutzbare „Off-the-shelf“-Prothese im kardiovaskulären TE darstellen könnte.

9. Literaturverzeichnis

1. Sharma, P., et al., *Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope*. J Med Life, 2019. **12**(3): p. 225-229.
2. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
3. Smit, F.E. and P.M. Dohmen, *Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now?* Med Sci Monit Basic Res, 2015. **21**: p. 1-3.
4. Alemany-Ribes, M., et al., *Toward a 3D cellular model for studying in vitro the outcome of photodynamic treatments: accounting for the effects of tissue complexity*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(15-16): p. 1665-74.
5. Chen, F.M. and X. Liu, *Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering*. Prog Polym Sci, 2016. **53**: p. 86-168.
6. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
7. Cao, Y., et al., *Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear*. Plast Reconstr Surg, 1997. **100**(2): p. 297-302; discussion 303-4.
8. Zilla, P., et al., *Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report*. J Vasc Surg, 1987. **6**(6): p. 535-41.
9. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annu Rev Biomed Eng, 2011. **13**: p. 27-53.
10. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. Eur Heart J, 2016. **37**(42): p. 3232-3245.
11. Jortveit, J., et al., *Sudden unexpected death in children with congenital heart defects*. Eur Heart J, 2016. **37**(7): p. 621-6.
12. Ross, D.N., *Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft*. Lancet, 1967. **2**(7523): p. 956-8.
13. Bruce Blaus. *Ross Procedure*. Medical gallery of Blausen Medical 2014 [cited 29.12.2021]; Available from: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Ross_Procedure.png.
14. Mirensky, T.L. and C.K. Breuer, *The development of tissue-engineered grafts for reconstructive cardiothoracic surgical applications*. Pediatr Res, 2008. **63**(5): p. 559-68.
15. Ozawa, T., et al., *Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. I176-82.
16. Shinoka, T. and H. Miyachi, *Current Status of Tissue Engineering Heart Valve*. World J Pediatr Congenit Heart Surg, 2016. **7**(6): p. 677-684.
17. Kitagawa, T., et al., *Techniques and results in the management of multiple muscular trabecular ventricular septal defects*. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **61**(7): p. 367-75.
18. Pok, S. and J.G. Jacot, *Biomaterials advances in patches for congenital heart defect repair*. J Cardiovasc Transl Res, 2011. **4**(5): p. 646-54.
19. Boyd, R., F. Parisi, and D. Kalfa, *State of the Art: Tissue Engineering in Congenital Heart Surgery*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2019. **31**(4): p. 807-817.
20. Gao, L., et al., *Large Cardiac Muscle Patches Engineered From Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells Improve Recovery From Myocardial Infarction in Swine*. Circulation, 2018. **137**(16): p. 1712-1730.

Literaturverzeichnis

21. Gaeta, M., et al., *European cardiovascular mortality over the last three decades: evaluation of time trends, forecasts for 2016*. Ann Ig, 2017. **29**(3): p. 206-217.
22. Domenech, M., et al., *Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration: Acellular Versus Cellular Scaffolds?* Tissue Eng Part B Rev, 2016. **22**(6): p. 438-458.
23. Nielsen, S.H., et al., *Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes*. Matrix Biol, 2019. **75-76**: p. 43-57.
24. Sulo, G., et al., *Trends in the risk of early and late-onset heart failure as an adverse outcome of acute myocardial infarction: A Cardiovascular Disease in Norway project*. Eur J Prev Cardiol, 2017. **24**(9): p. 971-980.
25. Gerber, Y., et al., *Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective*. Circ Heart Fail, 2016. **9**(1): p. e002460.
26. Kameli, S.M., et al., *Application of tissue-engineered pericardial patch in rat models of myocardial infarction*. J Biomed Mater Res A, 2018. **106**(10): p. 2670-2678.
27. Ochoa, E.R. and J.P. Vacanti, *An overview of the pathology and approaches to tissue engineering*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **979**: p. 10-26; discussion 35-8.
28. Lavik, E. and R. Langer, *Tissue engineering: current state and perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **65**(1): p. 1-8.
29. Coenen, A.M.J., et al., *Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers*. Acta Biomater, 2018. **79**: p. 60-82.
30. Boroumand, S., et al., *Heart valve tissue engineering: an overview of heart valve decellularization processes*. Regen Med, 2018. **13**(1): p. 41-54.
31. Chen, H., D.K. Agrawal, and F.G. Thankam, *Biomaterials-Driven Sterile Inflammation*. Tissue Eng Part B Rev, 2021. **28**(1): p. 22-34.
32. Christ, G.J., et al., *The pharmacology of regenerative medicine*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(3): p. 1091-133.
33. Fujimoto, K.L., et al., *In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(2): p. 648-54.
34. Vazquez, G., *Patients' satisfaction with anatomic polyurethane implants*. Gland Surg, 2017. **6**(2): p. 185-192.
35. Condello, V., et al., *Polyurethane scaffold implants for partial meniscus lesions: delayed intervention leads to an inferior outcome*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2019. **29**(1): p. 109-116.
36. Seal, B.L., T.C. Otero, and A. Panitch, *Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2001. **34**(4): p. 147-230.
37. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater, 2009. **5**(1): p. 1-13.
38. Wang, H.J., et al., *Stimulation of skin repair is dependent on fibroblast source and presence of extracellular matrix*. Tissue Eng, 2004. **10**(7-8): p. 1054-64.
39. Polanco, T.O., J. Xylas, and J.C. Lantis, 2nd, *Extracellular Matrices (ECM) for Tissue Repair*. Surg Technol Int, 2016. **28**: p. 43-57.
40. Dong, Y., et al., *Engineered bioactive nanoparticles incorporated biofunctionalized ECM/silk proteins based cardiac patches combined with MSCs for the repair of myocardial infarction: In vitro and in vivo evaluations*. Sci Total Environ, 2020. **707**: p. 135976.

Literaturverzeichnis

41. Gao, L., et al., *Myocardial Tissue Engineering With Cells Derived From Human-Induced Pluripotent Stem Cells and a Native-Like, High-Resolution, 3-Dimensionally Printed Scaffold*. *Circ Res*, 2017. **120**(8): p. 1318-1325.
42. Crupi, A., et al., *Inflammation in tissue engineering: The Janus between engraftment and rejection*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(12): p. 3222-36.
43. Koenig, F., et al., *Is Transcatheter Aortic Valve Implantation of Living Tissue-Engineered Valves Feasible? An In Vitro Evaluation Utilizing a Decellularized and Reseeded Biohybrid Valve*. *Artif Organs*, 2016. **40**(8): p. 727-37.
44. Stankus, J.J., et al., *Hybrid nanofibrous scaffolds from electrospinning of a synthetic biodegradable elastomer and urinary bladder matrix*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008. **19**(5): p. 635-52.
45. Fu, R.H., et al., *Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering*. *Cell Transplant*, 2014. **23**(4-5): p. 621-30.
46. Koenig, F., et al., *Successful decellularization of thick-walled tissue: Highlighting pitfalls and the need for a multifactorial approach*. *Int J Artif Organs*, 2019. **42**(1): p. 17-24.
47. He, J., et al., *A Safety Checkpoint to Eliminate Cancer Risk of the Immune Evasive Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells*. *Stem Cells*, 2017. **35**(5): p. 1154-1161.
48. Breymann, C., D. Schmidt, and S.P. Hoerstrup, *Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering*. *Stem Cell Rev*, 2006. **2**(2): p. 87-92.
49. Navarro, M., F. Pu, and J.A. Hunt, *The significance of the host inflammatory response on the therapeutic efficacy of cell therapies utilising human adult stem cells*. *Exp Cell Res*, 2012. **318**(4): p. 361-70.
50. von Nathusius, S., et al., *The cardiotomy reservoir - a preliminary evaluation of a new cell source for cardiovascular tissue engineering*. *Int J Artif Organs*, 2017. **41**(2): p. 115–123.
51. Fraser, C.D., Jr., *A clinical commentary on the article "biomaterials advances in patches for congenital heart defect repair" : cardiac bioengineering for congenital heart disease: time for progress*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. **4**(5): p. 655-7.
52. Westphal, R.J., et al., *Autologous transplantation of bone marrow adult stem cells for the treatment of idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Arq Bras Cardiol*, 2014. **103**(6): p. 521-9.
53. Lu, H., et al., *Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2011. **32**(10): p. 2489-99.
54. Deutzmann, R. and P. Bruckner, *Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 931-951.
55. Wikimedia Commons. *Illustration depicting extracellular matrix in relation to epithelium, endothelium and connective tissue*. [cited 24.11.2020]; Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Extracellular_Matrix.png.
56. Puklin-Faucher, E. and M.P. Sheetz, *The mechanical integrin cycle*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 2): p. 179-86.
57. Muncie, J.M. and V.M. Weaver, *The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate*. *Curr Top Dev Biol*, 2018. **130**: p. 1-37.
58. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: p. 4-27.

Literaturverzeichnis

59. Nakayama, K.H., L. Hou, and N.F. Huang, *Role of extracellular matrix signaling cues in modulating cell fate commitment for cardiovascular tissue engineering*. *Adv Healthc Mater*, 2014. **3**(5): p. 628-41.
60. Votteler, M., et al., *Stem cell microenvironments--unveiling the secret of how stem cell fate is defined*. *Macromol Biosci*, 2010. **10**(11): p. 1302-15.
61. Schenke-Layland, K., et al., *Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages*. *Stem Cells*, 2008. **26**(6): p. 1537-46.
62. Wijelath, E.S., et al., *Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells*. *J Vasc Surg*, 2004. **39**(3): p. 655-60.
63. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
64. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **127**(2): p. 399-405.
65. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth, *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1666**(1-2): p. 105-17.
66. Grauss, R.W., et al., *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005. **27**(4): p. 566-71.
67. Dahl, S.L.M., et al., *Decellularized Native and Engineered Arterial Scaffolds for Transplantation*. *Cell Transplant*, 2003. **12**(6): p. 659-666.
68. Keane, T.J., I.T. Swinehart, and S.F. Badylak, *Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. *Methods*, 2015. **84**: p. 25-34.
69. Pinchuk, L., *A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanes*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994. **6**(3): p. 225-67.
70. Xue, J., et al., *Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications*. *Chem Rev*, 2019. **119**(8): p. 5298-5415.
71. Kai, D., et al., *Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells*. *Biotechnol J*, 2013. **8**(1): p. 59-72.
72. Yniguez, F., *Tissue Engineering: Die Dezellularisierung zellbeschichteten Polyurethans: ein experimenteller Ansatz für die Herstellung eines biohybriden Materials als Bestandteil zukünftiger kardiovaskulärer Implantate*. 2020, LMU München: Medizinische Fakultät.
73. Muldrew, K. and L.E. McGann, *Mechanisms of intracellular ice formation*. *Biophys J*, 1990. **57**(3): p. 525-32.
74. Galvao, J., et al., *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. *Faseb j*, 2014. **28**(3): p. 1317-30.
75. Albini, A., et al., *Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number*. *Coll Relat Res*, 1988. **8**(1): p. 23-37.
76. Horridge, G.A. and S.L. Tamm, *Critical point drying for scanning electron microscopic sthdy of ciliary motion*. *Science*, 1969. **163**(3869): p. 817-8.
77. Labno, C. *Two Ways to Count Cells with ImageJ*. [cited 15.08.2021; Available from:

Literaturverzeichnis

- <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/3714/1208/5964/CellCounting.pdf>.
78. Iwase, H., et al., *Therapeutic regulation of systemic inflammation in xenograft recipients*. Xenotransplantation, 2017. **24**(2).
 79. Starnecker, F., et al., *Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(1): p. 153-162.
 80. Thierfelder, N., et al., *In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning*. Asaio j, 2013. **59**(3): p. 309-16.
 81. Herrmann, F.E., et al., *In vitro biological and mechanical evaluation of various scaffold materials for myocardial tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(4): p. 958-66.
 82. Kucinska-Lipka, J., et al., *Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **46**: p. 166-76.
 83. Williamson, M.R., R. Black, and C. Kielty, *PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3608-16.
 84. Clowes, A.W., et al., *Mechanisms of arterial graft failure. 1. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses*. Am J Pathol, 1985. **118**(1): p. 43-54.
 85. Schaefermeier, P.K., et al., *Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells*. Asaio j, 2009. **55**(1): p. 86-92.
 86. Guo, X., et al., *Endothelial Cell Migration on Poly(epsilon-caprolactone) Nanofibers Coated with a Nanohybrid Shish-Kebab Structure Mimicking Collagen Fibrils*. Biomacromolecules, 2020. **21**(3): p. 1202-1213.
 87. Lehle, K., et al., *Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **90**(1): p. 312-8.
 88. Bourget, J.M., et al., *Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering*. Biomaterials, 2012. **33**(36): p. 9205-13.
 89. Aleksieva, G., et al., *Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering*. Biomed Eng Online, 2012. **11**: p. 92.
 90. Hammerschmidt, S., M. Rohde, and K.T. Preissner, *Extracellular Matrix Interactions with Gram-Positive Pathogens*. Microbiol Spectr, 2019. **7**(2).
 91. Vaca, D.J., et al., *Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria*. Med Microbiol Immunol, 2020. **209**(3): p. 277-299.
 92. Qu, Y., et al., *Thrombospondin-1 protects against pathogen-induced lung injury by limiting extracellular matrix proteolysis*. JCI Insight, 2018. **3**(3).
 93. Drubaix, I., et al., *Preliminary data on the age-dependent decrease in basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in the human vein wall and in their influence on cell proliferation*. Gerontology, 1998. **44**(1): p. 9-14.
 94. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.

Literaturverzeichnis

95. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
96. Givant-Horwitz, V., B. Davidson, and R. Reich, *Laminin-induced signaling in tumor cells*. Cancer Lett, 2005. **223**(1): p. 1-10.
97. Ramovs, V., L. Te Molder, and A. Sonnenberg, *The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer*. Matrix Biol, 2017. **57-58**: p. 213-243.
98. Sun, T., et al., *Blockade of a Laminin-411-Notch Axis with CRISPR/Cas9 or a Nanobioconjugate Inhibits Glioblastoma Growth through Tumor-Microenvironment Cross-talk*. Cancer Res, 2019. **79**(6): p. 1239-1251.
99. Kruger-Genge, A., et al., *Effects of different components of the extracellular matrix on endothelialization*. Clin Hemorheol Microcirc, 2016. **64**(4): p. 867-874.
100. Li, J., Y.P. Zhang, and R.S. Kirsner, *Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(1): p. 107-14.
101. Kramer, R.H., *Extracellular matrix interactions with the apical surface of vascular endothelial cells*. J Cell Sci, 1985. **76**: p. 1-16.
102. Madri, J.A., et al., *Effects of soluble factors and extracellular matrix components on vascular cell behavior in vitro and in vivo: models of de-endothelialization and repair*. J Cell Biochem, 1991. **45**(2): p. 123-30.
103. Lubkin, A. and V.J. Torres, *Bacteria and endothelial cells: a toxic relationship*. Curr Opin Microbiol, 2017. **35**: p. 58-63.
104. Oliveira, W.F., et al., *Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants*. J Hosp Infect, 2018. **98**(2): p. 111-117.
105. Feng, W., et al., *Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **62**: p. 105-12.
106. Kuehl, R., et al., *Preventing Implant-Associated Infections by Silver Coating*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(4): p. 2467-75.
107. Qin, H., et al., *In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium*. Biomaterials, 2014. **35**(33): p. 9114-25.
108. Drouet, M., et al., *Endothelial Cell Toxicity of Vancomycin Infusion Combined with Other Antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(8): p. 4901-6.
109. Liao, C., Y. Li, and S.C. Tjong, *Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2): p. 449.
110. Matuska, A.M. and P.S. McFetridge, *The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015. **103**(2): p. 397-406.
111. Della Barbera, M., et al., *Morphologic studies of cell endogenous repopulation in decellularized aortic and pulmonary homografts implanted in sheep*. Cardiovasc Pathol, 2015. **24**(2): p. 102-9.
112. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
113. Simsa, R., et al., *Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0209269.
114. Schenke-Layland, K., et al., *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*. J Struct Biol, 2003. **143**(3): p. 201-8.

Literaturverzeichnis

115. Kawazoye, S., et al., *The mechanism of interaction of sodium dodecyl sulfate with elastic fibers*. J Biochem, 1995. **117**(6): p. 1254-60.
116. Kapuscinski, J. and B. Skoczylas, *Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole.2HCl or DCI 4',6-dicarboxyamide-2-phenyl indole*. Nucleic Acids Res, 1978. **5**(10): p. 3775-99.
117. Chen, S.H., Y. Chang, and K. Ishihara, *Reduced Blood Cell Adhesion on Polypropylene Substrates through a Simple Surface Zwitterionization*. Langmuir, 2017. **33**(2): p. 611-621.
118. Aydin, O., et al., *The effect of thymoquinone coating on adhesive properties of polypropylene mesh*. BMC Surg, 2017. **17**(1): p. 40.
119. Courtman, D.W., et al., *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction*. J Biomed Mater Res, 1994. **28**(6): p. 655-66.
120. Schenke-Layland, K., et al., *Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 497-509.
121. Lichtenberg, A., et al., *Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(2): p. 287-93; discussion 293-4.
122. Lee, Y.S., et al., *Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel*. Asaio j, 1993. **39**(3): p. M740-5.
123. Adipurnama, I., et al., *Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review*. Biomater Sci, 2016. **5**(1): p. 22-37.
124. Oh, J., J. Lee, and K. Park, *Tyrosinase-mediated surface grafting of cell adhesion peptide onto micro-fibrous polyurethane for improved endothelialization*. Macromolecular Research, 2012. **20**(11): p. 1150-1155
125. Kadish, J.L., C.E. Butterfield, and J. Folkman, *The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells*. Tissue Cell, 1979. **11**(1): p. 99-108.
126. Geenen, I.L., et al., *Endothelial cells (ECs) for vascular tissue engineering: venous ECs are less thrombogenic than arterial ECs*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(5): p. 564-76.
127. Liu, T., et al., *Endothelialization of implanted cardiovascular biomaterial surfaces: the development from in vitro to in vivo*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(10): p. 3754-72.
128. Bystron, M., et al., *Randomized comparison of endothelial progenitor cells capture stent versus cobalt-chromium stent for treatment of ST-elevation myocardial infarction. Six-month clinical, angiographic, and IVUS follow-up*. Catheter Cardiovasc Interv, 2010. **76**(5): p. 627-31.
129. Syedain, Z., et al., *6-month aortic valve implantation of an off-the-shelf tissue-engineered valve in sheep*. Biomaterials, 2015. **73**: p. 175-84.
130. Weber, B., et al., *Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model*. Biomaterials, 2013. **34**(30): p. 7269-80.
131. Baheiraei, N., et al., *Synthesis, characterization and antioxidant activity of a novel electroactive and biodegradable polyurethane for cardiac tissue engineering application*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **44**: p. 24-37.
132. He, S., et al., *Preservation of conductive propagation after surgical repair of cardiac defects with a bio-engineered conductive patch*. J Heart Lung Transplant, 2018. **37**(7): p. 912-924.

Literaturverzeichnis

133. Hofmeyr, L., P. Pohlner, and D.J. Radford, *Long-term complications following surgical patch closure of multiple muscular ventricular septal defects*. *Congenit Heart Dis*, 2013. **8**(6): p. 541-9.
134. Zhang, J., et al., *Can We Engineer a Human Cardiac Patch for Therapy?* *Circ Res*, 2018. **123**(2): p. 244-265.
135. Stokes, K., R. McVenes, and J.M. Anderson, *Polyurethane elastomer biostability*. *J Biomater Appl*, 1995. **9**(4): p. 321-54.
136. Thomas, V., T.V. Kumari, and M. Jayabalan, *In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly(urethane urea) for blood contact applications*. *Biomacromolecules*, 2001. **2**(2): p. 588-96.
137. Seifalian, A.M., et al., *In vivo biostability of a poly(carbonate-urea)urethane graft*. *Biomaterials*, 2003. **24**(14): p. 2549-2557.
138. Xu, C., et al., *Triggerable Degradation of Polyurethanes for Tissue Engineering Applications*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015. **7**(36): p. 20377-88.
139. Guelcher, S.A., *Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008. **14**(1): p. 3-17.
140. Kirkness, M.W., K. Lehmann, and N.R. Forde, *Mechanics and structural stability of the collagen triple helix*. *Curr Opin Chem Biol*, 2019. **53**: p. 98-105.
141. Wollmann, L.C., et al., *Histological and Biomechanical Characteristics of Human Decellularized Allograft Heart Valves After Eighteen Months of Storage in Saline Solution*. *Biopreserv Biobank*, 2020. **18**(2): p. 90-101.
142. Choe, J.A., et al., *Biomaterial characterization of off-the-shelf decellularized porcine pericardial tissue for use in prosthetic valvular applications*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(7): p. 1608-1620.
143. Lin, C.H., et al., *A fiber-progressive-engagement model to evaluate the composition, microstructure, and nonlinear pseudoelastic behavior of porcine arteries and decellularized derivatives*. *Acta Biomater*, 2016. **46**: p. 101-111.
144. Zouhair, S., et al., *Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability*. *Acta Biomater*, 2019. **84**: p. 208-221.

10. Anhang

Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Produktnr.	Hersteller *
Aceton	1.000014.5000	Merck KgaA, Darmstadt
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	D9654-10mg	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampuwa 10 l Kabi Container	1080181	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Formalin 4 % (Roti-Histofix)	P087.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Histol (Xylol-Ersatz)	6640.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (MetOH)	1.06009.2500	Merck KgaA, Darmstadt
Histosec® Pastillen (Paraffin)	1.15161.2504	Merck KgaA, Darmstadt
Medium 199 Earle's	F0665	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin-Streptomycin Solution Stabilized (5000 I. E. Penicillin + 5 mg Streptomycin/mL)	P4458	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetal Bovine Serum	S0115	Biochrom GmbH, Berlin
Gentamicin (50 mg/mL)	15750-037	Gibco®, Life Technologies Inc, Grand Island NY, USA
Heparin-Natrium 25.000 I. E. / 5 ml	126/317126/04 03	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Human Albumin 20 % (200 g/l)	6861364	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kollagenase Typ 2, CLS-2 (300 U / mg)	4177	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
Endothelial Cell Growth Medium + SupplementMix	C-22010	Promocell GmbH, Heidelberg
Fibroblast Growth Medium + SupplementMix	C-23010	Promocell GmbH, Heidelberg
Phosphate Buffered Saline	L 1825	Biochrom GmbH, Berlin
Flüssigstickstoff	<i>intern</i>	Linde GmbH, Pullach
Silikonpaste Báysilone 35 g (hochviskos)	291-1230	GE Bayer Silicones GmbH & Co. KG, Leverkusen
Target Retrieval Solution 10x Konzentrat pH 6	S1699	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Trypsin-EDTA Solution 10x	T4174	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid ≥99.5 %	D5879	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung 0,4 %	T8154	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sodium Deoxycholate	D6750-100G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sodium dodecyl sulphate ≥99 %	0183.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton® X 100 (Alkylphenyl- polyethylenglykol, C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀)	3051.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Propidiumjodid	81845-25mg	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anhang

SYTO 9 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain	S-34854-100µl	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (30, 50, 70 bzw. 96 %)	<i>intern</i>	Klinikum der Universität München
Ethanol absolut (≥99,5 %, reinst)	5054	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl 1 N)	1.09970	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	6495	Merck KGaA, Darmstadt
CO ₂ -Gasflasche + Steigrohr, 20 kg	<i>intern</i>	Linde GmbH, Pullach
Argon-Gasflasche, 30 kgx	<i>intern</i>	Linde GmbH, Pullach
Proteinase	P8038	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris Base (Molekulargewicht 121.14)	T1503	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EDTA-Na ₂	E-4884	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sodium cacodylate Trihydrate (Na-CaCO)	C0250 / C4945	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glutaraldehyd-Lösung 25 %	G400-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Monoclonal Mouse Antibody CD144 (VE- Cadherin) Clone TEA 1/31	IM1597	Beckman Coulter INC, Marseille, FRA
Anti-Fibronectin antibody produced in rabbit (polyclonal)	F3648	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-COL1A1 antibody produced in rabbit	HPA008405	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Monoclonal Anti-Collagen, Type IV antibody produced in mouse	C1926	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Elastin antibody	ab21610	Abcam, Cambridge, UK
Monoclonal Anti-Laminin antibody produced in mouse clone LAM-89	L8271	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Fibroblasts Antibody, clone TE-7	CBL271	Millipore GmbH, Schwalbach
Monoclonal Mouse Anti Human Clone CD31 JC70A Endothelial Cell	M0823	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Antibody Diluent	S3022	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Brij® 35-Lösung (Polyalkylenglycoether)	1.01894.0100	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ O ₂ 30 %	21676-3	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit	SK 4200	Vector Laboratories INC, California, USA
HRP Detection System	951D-30	Medac GmbH, Hamburg

Anhang

Verwendete Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ / Liefer-Nr.	Hersteller *
Geradwandige PPCO-Weithalsbecher mit Verschluss (1000 ml)	2118-0032	Nalgene, Rochester, NY, USA
Discofix® C-3, arzneimittelbeständig	16494C	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Handschuhe „Gentle Skin Premium OP“	9021-7,5	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
BD Discardit II Spritzen (steril)	300928 (2 ml), 309110 (10 ml), 300296 (20 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Microlance 3™ Kanülen 20 G (0,9 mm)	301300	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gefäß-/Kanülier-Kanülen	30004	Medtronic GmbH, Meerbusch
Diverse (Bull-Dog-)Klemmen, Scheren, Pinzetten, Stahllineale, Nieren- und sonstige Metallschalen (dampfsterilisiert)	<i>intern</i>	Klinikum der Universität München
Millex-GS Spritzenfilter 0,22 µm sterilisiert	SLGS033SS	Millipore GmbH, Schwalbach
Schraubröhre 15 ml, 120x17mm, PP (steril)	62.554.002	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schraubröhre 50 ml, 115x28mm, PP (steril)	62.559.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Färbekasten aus Glas mit Falzdeckel (ca. 105 x 85 x 80 mm) + Färberahmen für 10 Objektträger + Drahtbügel zum Einsetzen	2480, 2481, 2482	Wagner & Munz GmbH, München
Zellkulturflasche 12,5 cm ² (25 ml Canted Neck, tissue-culture treated polystyrene)	353107	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflasche 25 cm ² (50 ml Canted Neck, Surface Modified Polystyrene)	353808	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflasche 175 cm ² (Schräghals)	83.1812.002	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Petri-Pad culture dish system (47 mm)	PD1004700	Millipore GmbH, Schwalbach
Petrischalen aus Polystyren (60 mm, 100 mm)	150288 (60 mm) / 4021 (100 mm)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Deckgläser 24 x 24 mm	H875.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipetten 2,5 µl / 10 µl / 100 µl / 200 µl	„Research“	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 20 µl	„Research plus“	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 1000 µl	„Reference“	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (0,1-2,5 µl / 0,1 - 20 µl / 2 - 100 µl / 20-200 µl / 1000 µl / 50 - 1.250 µl)	70.1130.212, 70.1116.210, 70.760.212, 70.760.211, 70.762.200, 70.1186.210	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Transferpipette 3,5 ml (LD-PE)	86.1171	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (Polystyrene, steril) 1 ml / 2 ml / 5 ml / 10 ml / 50 ml	4485, 4486, 4487, 4488, 4490	Costar, Corning INC, Corning, NY, USA
Serologische Pipette 25 ml (steril)	760180	Greiner bio-one, Frickenhausen

Anhang

Cryo Tube vials Polyethylen (1,8 ml)	375418	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Hautmarkierstift Standardspitze	PS3150	Purple Surgical, Shenley, Herts, UK
Parafilm „M“ Labor-Verpackungsfolie	PM-996	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Chir. Nadel-Faden-Kombination DSM 24 + Supolene 3-0 grün 0,75 m	91513	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg
Chir. Nadel-Faden-Kombination RB-1 + PROLENE 5-0 Polypropylen blau monofil 0,9 m	8556 H	Ethicon, Somerville, NJ, USA
Chir. Faden Ethibond Excel 4-0	6935H	Ethicon, Somerville, NJ, USA
Reaktionsgefäße „Safe Lock“ (0,5 / 1,5 / 2 ml)	0030121023, 0030120086, 0030120094	Eppendorf AG, Hamburg
Standard-Reagiergefäße „Easy Cap“ 1,5 ml	72.690.550	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einweg-Zählkammer Neubauer Improved C-Chip	DHC-N01	Digital Bio Technology Co., Ltd., Suwon, Südkorea
Faltenfilter	10 311 647	Whatman
Färbetrog nach Hellendahl (PMP)	355	Kartell Labware, Noviglio, Italien
Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Flaschenaufsatzfilter, PES-Membran (500 ml, 0.2 bzw. 0.45 µm)	595-4520 295-4545	Nalgene, Rochester, NY, USA
500 mL Traditional Style Polystyrene Storage Bottles with 45 mm Caps	8393	Costar, Corning INC, Corning, NY, USA
Sicherheitsskalpell Nr. 20	BA820SU	Aesculap AG, Tuttlingen
Teflonartikel (Ringe diverser Durchmesser, Befestigungskranz, 42-mm-Stäbe)	<i>Laborwerkstatt</i>	Klinikum der Universität München
Falcon® Platten für Gewebekulturen (6 / 12 / 24 Wells)	353046 (6-Well) 353043 (12-Well) 353047 (24-Well)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
REM-Stiftprobenteller Alu (12,5 mm)	3725622	PLANO GmbH, Wetzlar
Leit-Tabs (doppelseitig klebend)	3700718	PLANO GmbH, Wetzlar
Einbettkassetten + Deckel (Polyoxymethylen)	9.160 844	LLG Labware, Meckenheim
Microtome Blade (Stainless Steel)	S35	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Cryomatrix Einbettharz	6769006	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA
Magnet-/Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger	J1800AMNZ	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium	S1964	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Deckgläser (24 x 50 mm)	11911998	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Laborflasche 500 ml (Weithals mit Schraubverschluss)	215-1785	VWR International GmbH, Darmstadt
Druckausgleichset	215-2444	VWR International GmbH, Darmstadt

Anhang

Verwendete Geräte

Bezeichnung	Typ / Liefer-Nr.	Hersteller *
Wasserbad (für Paraffin)	Medingen 22	Firmengruppe Med Preissler
Schüttelwasserbad	SW23	Julabo GmbH, Seelbach
Inkubator APT.line mit Heißluftsterilisation und hitzesterilisierbarem CO ₂ -Sensor	CB210	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen
CO ₂ -Inkubator	Heracell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar Airflow	Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inverted Phase Contrast Microscope	Axiovert 35	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
LABOPORT®-Membran-Vakuumpumpe (6 l/min, Vakuum 100 mbar)	N86KN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Zentrifuge Rotina 46 R	4610	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
pH-Meter inoLab pH Level 1	8F93	WTW, Weilheim
Pipetboy acu	155018	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Gefrier-/Kühlschränke, diverse (4° C, - 20° C)	Sikafrost Kabinett, Comfort Plus, u. a.	Siemens AG, München
Gefrier-/Kühlschränke, diverse (bis - 20° C)	Comfort NoFrost, u. a.	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Ultratiefkühlschrank HERAfreeze (- 86° C)	HFU 486 Basic	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Beschichtungszylinder mit Rotationshalterung	<i>Laborwerkstatt</i>	Klinikum der Universität München
Analysenwaage ABS	770-13	KERN & Sohn GmbH, Balingen
Wipptisch Rocky 3D (Plattform 300 x 245 mm)	99720	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Schüttelinkubator	KS 15 B / TH 15	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen
Mikroskop Axio Observer mit zugehöriger Power Supply und Fluoreszenzlampe	Z1 / 231 / HXP 120	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Rasterelektronenmikroskop EVO	LS 10	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kritisch-Punkt-Trockner	CPD 030	BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein
Präparatkorb (Kritisch-Punkt-Trockner)	BU 011 127-T	BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein
Sample Sputter Coater	SCD 050	BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein
Durchlichtmikroskop mit USB-gestütztem Kamera-Modul	DMR DC200/MC170 HD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Heated Paraffin Embedding Station HistoCore	Arcadia H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Wärmeschrank	ED-115	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen
Schlittenmikrotom	HM 400 R	Microm GmbH, Walldorf
Paraffinstreckbad rund (beheizt)	25900	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster
Mikroskop EVOS XL Core Imaging System	AMEX100	Advanced Microscopy Group, Bothell, WA, USA
Freezing Unit (Mikrotom)	KS-34-S	Microm GmbH, Walldorf
Mikrowelle 900 W	HF22024	Siemens AG, München

*Die Firmensitze aller genannten Hersteller befinden sich, soweit nicht anders angegeben, in Deutschland.

Versuch der EZM-Herstellung durch dynamische Inkubation von PU mit FB

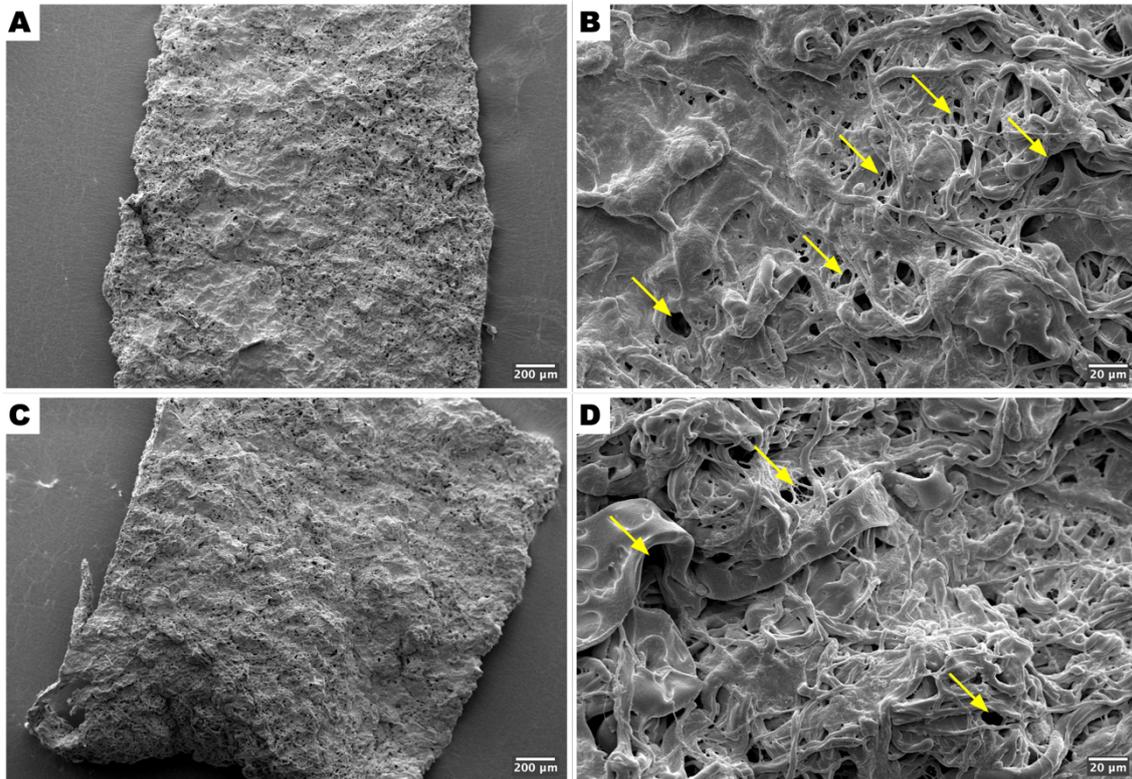


Abbildung 10-1 REM-Ergebnisse eines Vorversuchs, bei dem durch dynamische Inkubation von PU mit FB eine homogene EZM erzeugt werden sollte. (A: Übersichtsaufnahme Vorderseite, B: Detailaufnahme Vorderseite, C: Übersichtsaufnahme Rückseite, D: Detailaufnahme Rückseite). Es zeigte sich eine für die weiteren Versuche nicht ausreichend homogene Bedeckung des PU mit FB und EZM-Strukturen. Die lückenhafte Oberflächenschicht lässt immer wieder die darunter liegende Grundstruktur des PU und Löcher erkennen (Pfeile), sodass dieser Ansatz zur EZM-Erzeugung im Weiteren durch ein statisches Verfahren ersetzt wurde.

Durchführung einer EC-Verdünnungsreihe auf EZM-haltigem PU

Als Vorversuch (n = 5) erfolgte die Dezellularisierung von je zehn FB-besiedelten, EZM-haltigen Patches über 24 h in einer steril filtrierten PBS-Lösung mit 0,5 % SD + 0,5 % SDS. Der Wipptisch sorgte mit 4 ½ cycles/min für gleichmäßige Exposition der Patches gegenüber der Dezellularisierungslösung in dampfsterilisierten 1000-ml-PP-Bechern. Nach Waschzyklen in PBS über 6 x 24 h mit 0,2 % PenStrep wurden EC jeweils einer Zellkulturlinie pro Versuchsdurchgang (max. P5) in 6-Well-Platten statisch auf der EZM-haltigen Seite der Patches ausgebracht (Abbildung 10-2).

Für fünf gestaffelte Zellkonzentrationen (100 % = 750.000/cm², 66 % = 495'000/cm², 33 % = 247'500/cm², 15 % = 112'500/cm² und 5 % = 37'500/cm²) wurden je zwei Proben angelegt, zudem eine Kontrolle (100 %) auf nativem PU.

Anhang

Teflonringe begrenzen die Aussaatfläche der in je 500 µl ECGM gelösten Zellen auf 1 cm². Nach einer Stunde wurde außerhalb der Ringe 2,5 ml frisches ECGM zugegeben, nach einer weiteren Stunde bei mutmaßlich abgeschlossener Zellsedimentation die Ringe entfernt. Insgesamt wurde der Ansatz 24 h im Brutschrank inkubiert.

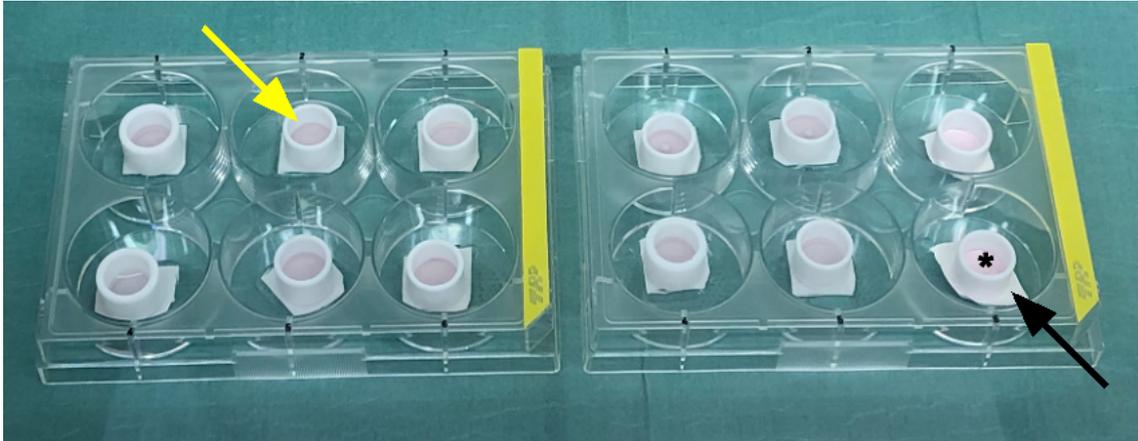


Abbildung 10-2 Versuchsaufbau der EC-Verdünnungsreihe: in zwei 6-Well-Platten wurden neben einer Nativprobe 100 %, 66 %, 33 %, 15 % und 5 % der Referenzzahl von 750.000 Zellen/cm² auf dezellularisierten EZM-haltigen PU-Patches (schwarzer Pfeil) über 24 h inkubiert. Teflonringe (gelber Pfeil) begrenzen die der eingebrachten Zellsuspension zur Verfügung stehende Wachstumsfläche (Stern) auf 1 cm².

Zur Auswertung der Anwachsrate kam eine Kernfärbung mit DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zum Einsatz, das mittels Interkalation mit der DNS im Zellkern wirkt. Auf Basis einer Stocklösung mit $c = 20 \text{ mg/ml}$ wurde in Aqua ad iniectabilia („Ampuwa“, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D) und mit weiterer Verdünnung in PBS eine Arbeitslösung mit $c_{\text{DAPI}} = 0,1 \text{ µg/ml}$ hergestellt. Unter unsterilen Bedingungen wurde das Probenmaterial zunächst mit PBS gewaschen und durch ausreichende Bedeckung mit MetOH:Aceton (Merck KgaA) im Verhältnis 1:1 über einen Zeitraum von 2 min bei RT fixiert. Nach zweimaliger erneuter Waschung mit PBS für jeweils 3 min wurden die Zellkerne durch Bedeckung mit der DAPI-Arbeitslösung unter Lichtausschluss über 20 min angefärbt. Die Lösung wurde anschließend abgenommen und der Ansatz erneut 2 x 3 min mit PBS gewaschen. Unmittelbar darauf erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie bei einer Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\text{Abs}} = 340 \text{ nm}$, was die im Ansatz enthaltenen Zellkerne zur Emission blauen Lichts anregte (Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$).

Anhang

Das günstigste Gleichgewicht zwischen homogenem Bewuchs und einer ausreichenden Vereinzelung der Farbsignale, um diese später computergestützt halbautomatisiert zu zählen, erbrachte die anschließende Fluoreszenzmikroskopie vitaler und letaler Zellen für die 15%-Gruppe. Eine etwas höhere Dichte der Zellecke erschien zwar wünschenswert; bei 33 % war aber bereits keine ausreichende Trennung der Farbsignale mehr möglich. In Zusammenschau wurde daher für die Exposition im Rotationszylinder eine Zellzahl von 20 % der ursprünglichen Menge (entsprechend $150'000 \text{ EC/cm}^2$) festgelegt.

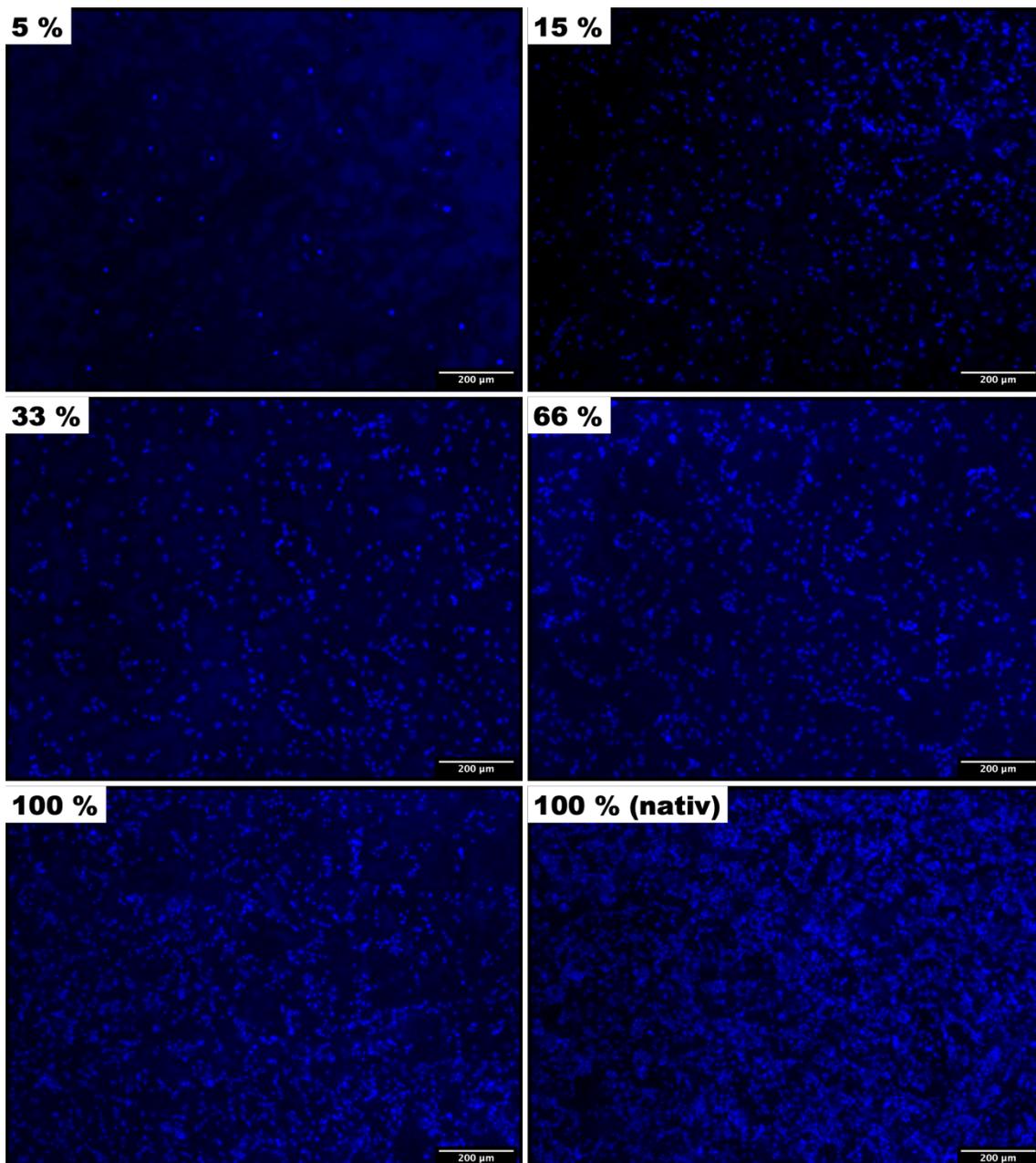


Abbildung 10-3 Repräsentative Aufnahmen von DAPI-Zellkernfärbungen der EC-Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen von EC, die auf dezellularisiertem, EZM-haltigem PU und einer Nativkontrolle ausgesät wurden. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die übliche Zellzahl von $7,5 \times 10^5$ Zellen.

Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission bei der LMU München



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Dr. Nikolaus Thierfelder
Herzchirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum der Universität München
Marchioninstr. 15
81377 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 440055191
Telefax+49 (0)89 440055192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de
www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Anschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

27.04.2015 Hb/ck

Unser Zeichen: 259-15 (bitte bei Schriftwechsel angeben)

Antrag auf Unbedenklichkeitserklärung

Titel: Evaluation des Einsatzes von arteriellen und venösen Gefäßwandzellen im kardiovaskulären Tissue Engineering

Antragsteller: Dr. Nikolaus Thierfelder, Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München

Sehr geehrter Herr Dr. Thierfelder,

besten Dank für Ihr Schreiben (E-Mail) vom 27.04.2015, mit dem Sie um eine Unbedenklichkeitserklärung für das o.g. Projekt bitten.

Sofern Sie Ihre Untersuchungen nur retrospektiv anhand von Gefäßstücken und daraus isoliertem/verwendetem Zellmaterial durchführen, welche/s irreversibel anonymisiert sind/ist, d. h. dass auch die Bearbeiter keinen Rückschluss auf die personenbezogenen Daten der Probanden erhalten, bestehen keine ethisch- rechtlichen Bedenken gegen dieses Projekt.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung Ihres Vorhabens die ärztliche und juristische Verantwortung für die Verantwortung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Für Ihre Untersuchungen wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen



Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:

Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeiffer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zech

Patienteneinverständniserklärung zur Spende von Zellen



Patienteneinverständniserklärung zur Spende von Zellen für die herzchirurgische Forschung

Dr. med. Nikolaus Thierfelder
Leiter medizinische Forschung der
AG „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“
Telefon +49 0389 4400-74791
Telefax +49 0389 4400-78671
Email: Nikolaus.Thierfelder@med.uni-muenchen.de
http://hch.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Marchioninstr. 15
81377 München

Sehr geehrter Patient,

die Forschungsgruppe „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“ der herzchirurgischen Klinik versucht neuartige, individualisierte Therapiekonzepte für die Zukunft zu entwickeln und zu etablieren. Hierfür sind wir auf die Verwendung von gespendetem Gewebe, insbesondere Zellen, angewiesen. Es ist möglich, dass sich während ihrer Herzoperation zirkulierende Zellen in der Herz-Lungenmaschine (HLM) abgesetzt haben. Normalerweise haben diese Zellen keine Verwendung und werden mit Teilen der HLM nach der OP entsorgt. Wir würden sie jedoch bitten, diese Zellen zur Forschungsverwendung freizugeben.

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

Ich hatte ausreichend Zeit, mich für die Spende der, während meiner OP in der HLM abgesetzten Zellen frei zu entscheiden und weiß, dass die Verwendung nur zu medizinischen Forschungszwecken dient.

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

Ich erkläre hiermit mein freiwilliges Einverständnis zur Verwendung der übrig gebliebenen Zellen aus meiner Operation.

Eine Kopie der Einverständniserklärung habe ich erhalten.

München, den

Unterschrift des Patienten

Unterschrift des aufklärenden Arztes

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



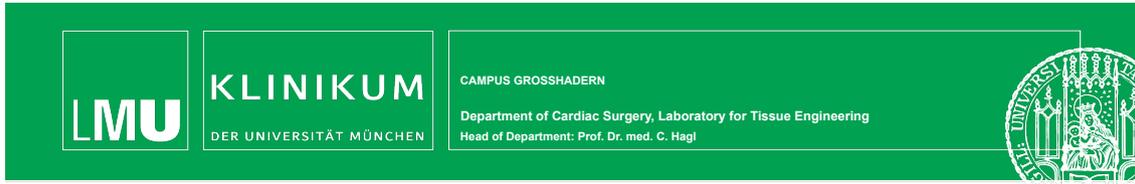
Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik:
Öffentl. Verkehr:

Prof. Dr. med. Christian Hagl
U6, S6, 266, 269 oder N41 bis Haltestelle Klinikum Großhadern

Kongress-Vorveröffentlichung (TERMIS-EU 2017, Davos)

Teile dieser Arbeit fanden Eingang in die Poster-Präsentation „Where to go in cardiovascular research? A comprehensive evaluation of different tissue engineering and regenerative approaches“ in der Sparte “Personalised Therapies for Regenerative Medicine” auf der TERMIS-EU 2017 Konferenz in Davos (Schweiz).



Where to go in Cardiovascular Research? A comprehensive Evaluation of different Tissue Engineering and Regenerative Approaches

N. Thierfelder^{1,2}, F. Starnecker¹, JS. Lee¹, M. Helm¹, F. Yniguez¹, B. Steinl¹, D. Bezuidenhout², C. Hagl¹, F. König¹
¹ Department of Cardiac Surgery, Ludwig-Maximilian University of Munich; ² Cardiovascular Research Unit, University of Cape Town

Introduction																								
<p>Over the last decades, cardiovascular tissue engineering (TE) became a major field in medical research and clinical application. Commonly used materials are either synthetic, biologic or biohybrid. At the moment two different strategies are pursued: The creation of “living” tissue-engineered constructs and the application of acellular regenerative materials. Considering recent publications, up to now there is no strategy predominant. The aim of this study was to provide a guideline for further cardiovascular research by highlighting possibilities and drawbacks of different strategies. Three different tissue-engineered and regenerative constructs and their production processes were investigated.</p>																								
Methods	Principle																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tissue-Engineered</th> <th>Regenerative / Bio-hybrid</th> <th>Regenerative / Decellularized</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> <p>Electrospun polyurethane scaffolds were sequentially seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with human saphenous vein endothelial cells and fibroblasts. After static incubation (6 days), scaffolds were conditioned by pulsatile low-flow (500 ml/min) exposure for 5 days. Implantation simulation was performed by mechanical stressing (crimping and balloon dilatation). Subsequently samples were exposed to pulsatile flow (1100 ml/min) for 2 days.</p> </td> <td> <p>Electrospun polyurethane scaffolds were seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with saphenous vein fibroblasts and cultivated for 10 days. Thereafter, scaffolds were dynamically decellularized with 0.5% SD / 0.5% SDS for 16 h, followed by a washing procedure. Re-cultivation efficiency of the bio-hybrid scaffolds was evaluated by dynamic incubation with human endothelial cells. Storbility of the samples was assessed for up to one year.</p> </td> <td> <p>As standards in cardiovascular application, bovine pericardium and porcine aorta/aortic valves were used for decellularization. Samples were carefully selected and prepared prior to decellularization with 0.5% SD / 0.5% SDS. Different treatment schemes were investigated, including different ways of sample movement and procedural variations (varying times; cyclic procedures). Furthermore, the effect of ultrasonic exposure was quantified.</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>Process</td> </tr> <tr> <td></td> <td> <p>Successful cell seeding was proved by positive staining against CD31 (endothelial specific) and TE-7 (fibroblast specific). After pulsatile low-flow conditioning, the cells showed flow dependent orientation and a confluent coverage of the electrospun polyurethane. The establishment of an extracellular matrix was proved by positive staining against collagen I & IV, laminin and fibronectin. Silencing of inflammatory markers (ICAM) was detected.</p> </td> <td> <p>Positive staining against extracellular matrix markers (a.o.: collagen, elastin) and negative DAPI-stains showed successful production of the biohybrid scaffold. Storage for up to 12 months in PBS was possible without histologic signs of degradation - An of-the-shelf application would be possible. In-vitro re-cultivation showed a significantly higher seeding efficiency of the bio-hybrid scaffolds compared to native electrospun polyurethane (ePU).</p> </td> <td> <p>Successful decellularization was proved by negative DAPI stain and histological proofs of extracellular matrix preservation. Intensified sample movement, ultrasonic exposure and cyclic treatment schemes lead to a significant increase of decellularization efficiency. Decellularization of pericardium and aorta was possible within 16h and 48h respectively. The whole process is associated with low cost and scaffolds showed a good storability.</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>Possibilities</td> </tr> <tr> <td></td> <td> <p>Manipulation (implantation simulation) lead to a massive cell death and a significant destruction of the living constructs. Consequently, a strong increase of inflammatory markers was detected. The production process took several weeks and was associated with high costs. Furthermore, the whole production process is vulnerable to infections and is just applicable in an autologous setting.</p> </td> <td> <p>Extracellular matrix quality and quantity is significantly depending on the used cell lines. However it is necessary to ensure a stable and reproducible extracellular matrix on the scaffolds for biomedical application. Therefore assessment of the used cells as well as of the produced extracellular matrix is essential. Additionally, the long production process and the need for non-xenogenic cell culture ingredients are rendering this approach to an expensive procedure. Furthermore, this kind of scaffold was not evaluated in in-vivo studies yet. Therefore, there are no results in terms of tissue remodelling and foreign body response available at the moment.</p> </td> <td> <p>Success of decellularization significantly depends on the applied protocol. Furthermore, there are high variations in some source materials (e.g. pericardium). Incomplete decellularization (remaining DNA) or damaged extracellular matrix can occur if material and decellularization procedure are not matching. A generale risk is the possible transmission of zoonotic diseases.</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>Risks</td> </tr> </tbody> </table>	Tissue-Engineered	Regenerative / Bio-hybrid	Regenerative / Decellularized				<p>Electrospun polyurethane scaffolds were sequentially seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with human saphenous vein endothelial cells and fibroblasts. After static incubation (6 days), scaffolds were conditioned by pulsatile low-flow (500 ml/min) exposure for 5 days. Implantation simulation was performed by mechanical stressing (crimping and balloon dilatation). Subsequently samples were exposed to pulsatile flow (1100 ml/min) for 2 days.</p>	<p>Electrospun polyurethane scaffolds were seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with saphenous vein fibroblasts and cultivated for 10 days. Thereafter, scaffolds were dynamically decellularized with 0.5% SD / 0.5% SDS for 16 h, followed by a washing procedure. Re-cultivation efficiency of the bio-hybrid scaffolds was evaluated by dynamic incubation with human endothelial cells. Storbility of the samples was assessed for up to one year.</p>	<p>As standards in cardiovascular application, bovine pericardium and porcine aorta/aortic valves were used for decellularization. Samples were carefully selected and prepared prior to decellularization with 0.5% SD / 0.5% SDS. Different treatment schemes were investigated, including different ways of sample movement and procedural variations (varying times; cyclic procedures). Furthermore, the effect of ultrasonic exposure was quantified.</p>		Process		<p>Successful cell seeding was proved by positive staining against CD31 (endothelial specific) and TE-7 (fibroblast specific). After pulsatile low-flow conditioning, the cells showed flow dependent orientation and a confluent coverage of the electrospun polyurethane. The establishment of an extracellular matrix was proved by positive staining against collagen I & IV, laminin and fibronectin. Silencing of inflammatory markers (ICAM) was detected.</p>	<p>Positive staining against extracellular matrix markers (a.o.: collagen, elastin) and negative DAPI-stains showed successful production of the biohybrid scaffold. Storage for up to 12 months in PBS was possible without histologic signs of degradation - An of-the-shelf application would be possible. In-vitro re-cultivation showed a significantly higher seeding efficiency of the bio-hybrid scaffolds compared to native electrospun polyurethane (ePU).</p>	<p>Successful decellularization was proved by negative DAPI stain and histological proofs of extracellular matrix preservation. Intensified sample movement, ultrasonic exposure and cyclic treatment schemes lead to a significant increase of decellularization efficiency. Decellularization of pericardium and aorta was possible within 16h and 48h respectively. The whole process is associated with low cost and scaffolds showed a good storability.</p>		Possibilities		<p>Manipulation (implantation simulation) lead to a massive cell death and a significant destruction of the living constructs. Consequently, a strong increase of inflammatory markers was detected. The production process took several weeks and was associated with high costs. Furthermore, the whole production process is vulnerable to infections and is just applicable in an autologous setting.</p>	<p>Extracellular matrix quality and quantity is significantly depending on the used cell lines. However it is necessary to ensure a stable and reproducible extracellular matrix on the scaffolds for biomedical application. Therefore assessment of the used cells as well as of the produced extracellular matrix is essential. Additionally, the long production process and the need for non-xenogenic cell culture ingredients are rendering this approach to an expensive procedure. Furthermore, this kind of scaffold was not evaluated in in-vivo studies yet. Therefore, there are no results in terms of tissue remodelling and foreign body response available at the moment.</p>	<p>Success of decellularization significantly depends on the applied protocol. Furthermore, there are high variations in some source materials (e.g. pericardium). Incomplete decellularization (remaining DNA) or damaged extracellular matrix can occur if material and decellularization procedure are not matching. A generale risk is the possible transmission of zoonotic diseases.</p>		Risks
Tissue-Engineered	Regenerative / Bio-hybrid	Regenerative / Decellularized																						
<p>Electrospun polyurethane scaffolds were sequentially seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with human saphenous vein endothelial cells and fibroblasts. After static incubation (6 days), scaffolds were conditioned by pulsatile low-flow (500 ml/min) exposure for 5 days. Implantation simulation was performed by mechanical stressing (crimping and balloon dilatation). Subsequently samples were exposed to pulsatile flow (1100 ml/min) for 2 days.</p>	<p>Electrospun polyurethane scaffolds were seeded (7.5×10^6 cells/cm²) with saphenous vein fibroblasts and cultivated for 10 days. Thereafter, scaffolds were dynamically decellularized with 0.5% SD / 0.5% SDS for 16 h, followed by a washing procedure. Re-cultivation efficiency of the bio-hybrid scaffolds was evaluated by dynamic incubation with human endothelial cells. Storbility of the samples was assessed for up to one year.</p>	<p>As standards in cardiovascular application, bovine pericardium and porcine aorta/aortic valves were used for decellularization. Samples were carefully selected and prepared prior to decellularization with 0.5% SD / 0.5% SDS. Different treatment schemes were investigated, including different ways of sample movement and procedural variations (varying times; cyclic procedures). Furthermore, the effect of ultrasonic exposure was quantified.</p>																						
	Process																							
	<p>Successful cell seeding was proved by positive staining against CD31 (endothelial specific) and TE-7 (fibroblast specific). After pulsatile low-flow conditioning, the cells showed flow dependent orientation and a confluent coverage of the electrospun polyurethane. The establishment of an extracellular matrix was proved by positive staining against collagen I & IV, laminin and fibronectin. Silencing of inflammatory markers (ICAM) was detected.</p>	<p>Positive staining against extracellular matrix markers (a.o.: collagen, elastin) and negative DAPI-stains showed successful production of the biohybrid scaffold. Storage for up to 12 months in PBS was possible without histologic signs of degradation - An of-the-shelf application would be possible. In-vitro re-cultivation showed a significantly higher seeding efficiency of the bio-hybrid scaffolds compared to native electrospun polyurethane (ePU).</p>	<p>Successful decellularization was proved by negative DAPI stain and histological proofs of extracellular matrix preservation. Intensified sample movement, ultrasonic exposure and cyclic treatment schemes lead to a significant increase of decellularization efficiency. Decellularization of pericardium and aorta was possible within 16h and 48h respectively. The whole process is associated with low cost and scaffolds showed a good storability.</p>																					
	Possibilities																							
	<p>Manipulation (implantation simulation) lead to a massive cell death and a significant destruction of the living constructs. Consequently, a strong increase of inflammatory markers was detected. The production process took several weeks and was associated with high costs. Furthermore, the whole production process is vulnerable to infections and is just applicable in an autologous setting.</p>	<p>Extracellular matrix quality and quantity is significantly depending on the used cell lines. However it is necessary to ensure a stable and reproducible extracellular matrix on the scaffolds for biomedical application. Therefore assessment of the used cells as well as of the produced extracellular matrix is essential. Additionally, the long production process and the need for non-xenogenic cell culture ingredients are rendering this approach to an expensive procedure. Furthermore, this kind of scaffold was not evaluated in in-vivo studies yet. Therefore, there are no results in terms of tissue remodelling and foreign body response available at the moment.</p>	<p>Success of decellularization significantly depends on the applied protocol. Furthermore, there are high variations in some source materials (e.g. pericardium). Incomplete decellularization (remaining DNA) or damaged extracellular matrix can occur if material and decellularization procedure are not matching. A generale risk is the possible transmission of zoonotic diseases.</p>																					
	Risks																							
Results	Risks																							

Conclusion

Production of functional “classical” TE constructs as well as regenerative biohybrid and biologic scaffolds was successful. However, manipulation – for example transcatheter heart valve implantation – of living TE constructs inflicted massive cell death and inflammation. Furthermore, these constructs require a sophisticated and expensive production process. On the other side acellular scaffolds showed a long shelf life, a good re-seeding efficiency and had low production costs. However the provision of bio-hybrid scaffolds is more expensive and complex than the production of decellularized scaffolds. In conclusion, we recommend focusing on regenerative approaches in cardiovascular research.

11. Danksagung

Mein Dank gebührt Herrn Professor Christian Hagl für die Möglichkeit, unter seiner Schirmherrschaft in der Klinik für Herzchirurgie dieses Projekt durchzuführen. Der Einblick in die experimentelle Medizin und ihre Schnittstellen zur klinischen Patientenversorgung hat sich als kostbare Erfahrung und Bereicherung für meine Laufbahn erwiesen. Herrn Dr. Bassil Akra danke ich für die seinerzeit wohlwollende Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Ich schätze mich glücklich, dort durch die engagierte und gründliche Betreuung von Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder, Herrn Dipl.-Ing. Fabian König und Herrn M. Sc. Maximilian Grab begleitet worden zu sein. Ihre Flexibilität, Bereitschaft zum Gedankenaustausch und oft kurzfristige theoretische wie praktische Unterstützung war alles andere als selbstverständlich und hat den erfolgreichen Abschluss dieses Projekts erst möglich gemacht. Zu tiefem Dank verpflichtet bin ich auch den technischen Assistentinnen Frau Ulrike Haas, Frau Eike Petersen, Frau Bettina Wimmer und Frau Barbara Steinl, die mir ausdauernd mit Ratschlägen, Recherche und praktischer Hilfestellung beistanden.

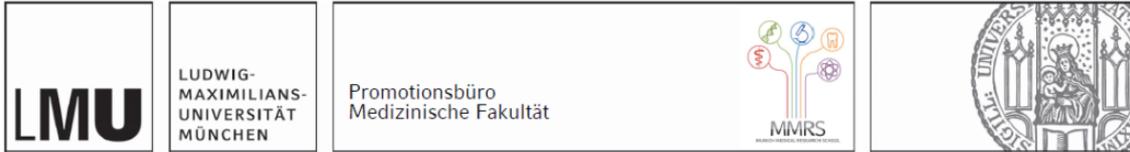
Ganz persönlich möchte ich Frau Dr. med. Bernadett Hilbert danken. Neben dem stetigen fachlichen Austausch waren ihr offenes Ohr, ihr Motivationstalent und ihr Enthusiasmus Freundschaftsdienste von unschätzbarem Wert. Auch Frau PhD Ariane Böhm danke ich in diesem Zusammenhang für kostbare Anregungen, das Teilen ihrer Erfahrung und Ablenkung in genau den richtigen Momenten.

In großer Liebe und Dankbarkeit bin ich meinen Eltern verbunden, Frau Gabriele Helm und Herrn Dr. med. Wolfgang Helm. Während meines gesamten Werdegangs hatte ich das Glück, sie als beständige Stütze an meiner Seite zu wissen. Ihre liebevolle und engagierte Begleitung war der beste vorstellbare Rückhalt beim Einstieg in meine berufliche Laufbahn. Mehr als nur einmal fanden sie die richtigen Worte, um mich anzuspornen diese Arbeit zu ihrem Ende zu bringen. Ich kann ihnen nicht genug danken für alles, was sie für mich getan haben und immer noch tun.

Zu guter Letzt und von ganzem Herzen danke ich Herrn Mohammad Ibrahim Hammada, der mich bei den abschließenden Arbeiten an dieser Niederschrift motiviert hat. Deine Begeisterung, Ibrahim, inspiriert mich jeden Tag dazu, ein anspruchsvollerer Arzt und ein besserer Mensch zu sein.

شكراً!

12. Eidesstattliche Versicherung



Helm, Matthias Wolfgang

Name, Vorname

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

**Dezellularisierte biohybride Scaffolds auf Polyurethan-Basis
und ihre In-vitro-Evaluation für den Einsatz als Implantat
im kardiovaskulären Tissue Engineering**

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

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

Hamburg, 21.12.2022

Ort, Datum

Matthias W. Helm

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

13. Publikationsliste

Helm M., Thierfelder N., Koenig F., Haas U., Fano C., Schmitz C., Hagl C., Akra B., *Entwicklung einer Methode zur effektiven In-vivo-re-Besiedelung zellfreier Polyurethan-Scaffolds auf Basis beschleunigt gebildeter Extrazellulärer Matrix.* Poster - Doktorarbeitstage Medizin, Klinikum der Universität München, 2014.

Thierfelder N., Starnecker F., Lee JS, **Helm M.**, Yniguez F., Steinl B., Bezuidenhout D., Hagl C., König F., *Where to go in Cardiovascular Research? A comprehensive Evaluation of different Tissue Engineering and Regenerative Approaches.* Poster - European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), Davos, Switzerland, 2017.