

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Medizintechnik

Ein neues kardiales Stammzellimplantat zur Therapie kardiomyodegenerativer Erkrankungen

Trixi Hollweck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. med., Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel
2. Univ.-Prof. Dr. rer. physiol., Dr. rer. biol. hum. habil. Günther Eißner,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 02.05.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 13.07.2011 angenommen.

Zusammenfassung

Das kardiale Tissue Engineering ist ein vielversprechender Ansatz zur Wiederherstellung von geschädigtem Herzmuskelgewebe nach einem Myokardinfarkt. Neben anderen Stammzellquellen hat der Transfer von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) zur ischämischen Region des Herzens möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Geweberegeneration. UCMSC stehen in großen Mengen ohne medizinische Intervention zur Verfügung, zeigen Selbsterneuerungspotential, immunologische Naivität und Multipotenz. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Differenzierbarkeit von UCMSC zu Kardiomyozyten durch den Vergleich verschiedener publizierter Protokolle untersucht. Die kardiomyogene Differenzierung von UCMSC (cUCMSC) wurde dabei durch die Behandlung mit 5-Azazytidin und Oxytocin sowie durch die Formierung von „embryoid bodies“ induziert. Umfangreiche morphologische und immunzytochemische Analysen von cUCMSC mit einem Panel an kardialen Markern zeigte eine effektivere kardiomyogene Differenzierung durch Oxytocin als durch 5-Azazytidin oder durch die Formierung von „embryoid bodies“. cUCMSC wiesen einen Kardiomyozyten-ähnlichen Phänotyp auf und exprimierten kardiale Proteine. Nach Verifizierung der UCMSC als geeignete Zellquelle zur Therapie kardiomyodegenerativer Erkrankungen, wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur geeigneten Verabreichungsform der Zellen angestellt. Eine Alternative zur Zelinjektion, die wenig Retention am Zielort gewährleistet, ist die Implantation von besiedelten Zellträgern auf die ischämische Region des Herzens. Es wurde die Besiedelungseffizienz von unbeschichteten und titanisierten Zellträgern aus expandierten Polytetrafluorethylen (ePTFE) unterschiedlicher Struktur mit UCMSC untersucht. Das GORE-TEX® Dualmesh® (DM) weist im Vergleich zu der planaren Oberfläche des GORE-TEX® kardiovaskulären Patches (CVP) eine gerippte Oberfläche auf. Die Untersuchung der Anwachsrate, Vitalität und Proliferation von UCMSC zeigte, daß titanisierte Zellträger, unabhängig von der Oberflächenstruktur, unbeschichteten Zellträgern überlegen sind. Mikroskopische Aufnahmen zeigten eine untypische, kugelförmige Gestalt von UCMSC auf unbeschichteten Zellträgern. UCMSC auf titanisierten Zellträgern zeigten dagegen ihre charakteristische spindelförmige Morphologie und eine homogene Besiedelung des titanisierten CVP. Zur Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit von UCMSC auf titanisierten CVP, wie sie der Myokardkontraktion entspricht, wurde ein pulsatiler Bioreaktor entwickelt. Das Design des Bioreaktors ermöglicht eine einfache Handhabung und eine definierte mechanische Beanspruchung dreier besiedelter Zellträger im Parallelbetrieb unter physiologischen Bedingungen. Orientierende Versuche zur Ermittlung der Anwachsrate und Morphologie von UCMSC nach mechanischer Belastung zeigten eine nahezu konfluente zelluläre Beschichtung auf titanisierten CVP. UCMSC nach mechanischer Belastung wiesen dabei im Vergleich zu UCMSC ohne mechanische Beanspruchung keine Schädigungen der

Zelloberfläche auf. Die Titanisierung von klinisch zugelassenem CVP ermöglicht somit die Retention von UCMSC unter statischen und dynamischen Bedingungen und stellt daher eine potentielle Zellverabreichungsform zur Wiederherstellung von geschädigtem Herzmuskelgewebe dar.

Abstract

Cardiomyoplasty represents a promising approach for the repair of the injured heart after myocardial infarction. Among other stem cell sources, the transfer of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord tissue (UCMSC) to the ischemic region of the heart may have a favorable impact on tissue regeneration. UCMSC can be obtained in large amounts without medical intervention, exhibit self renewal and immunological naivety as well as multipotency. Therefore, in the present study, different published protocols of cardiac differentiation designed for a variety of different stem cell types were compared to differentiate UCMSC into cardiomyocytes. Cardiac differentiation of UCMSC (cUCMSC) was triggered by 5-azacytidine, oxytocin as well as by forming of “embryoid bodies”. The morphological and immunocytochemical analysis of cUCMSC with an extensive panel of cardiac markers showed that oxytocin is a more potent inducer of cardiac differentiation than 5-azacytidine or the forming of “embryoid bodies”. cUCMSC reveal a cardiomyocyte-like phenotype and the expression of cardiomyocyte associated proteins. After verification of UCMSC as a suitable cell source for the therapy of cardiomyodegenerative diseases, experiments on the appropriate route of administration were performed. The use of cell seeded scaffolds implanted into the infarcted zone represents a promising alternative to direct cell injection with little retention at the target site. The seeding efficiency of UCMSC on uncoated and titanium-coated expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) scaffolds with different surface structures was determined. GORE-TEX® Dualmesh® offers a corduroy-like surface in contrast to the comparably planar surface of cardiovascular patch (CVP). The investigation of adherence, viability and proliferation of UCMSC demonstrates that titanium-coated scaffolds are superior to uncoated scaffolds, independent of the surface structure. Microscopic images reveal spherical UCMSC seeded on uncoated scaffolds. In contrast, UCMSC on titanium-coated scaffolds display their characteristic spindle-shaped morphology and a homogeneous coverage of CVP. In order to analyse UCMSC on titanium-coated CVP after mechanical stress imitating the myocardial contraction, a pulsatile bioreactor was developed. The design of the bioreactor enables a simple handling and defined mechanical stress of three seeded scaffolds at physiological conditions. Preliminary experiments to determine the adherence rate and morphology of UCMSC after mechanical loadings show an almost confluent cellular coating without damage on the cell surface. In summary, titanium coating of clinically approved CVP enhances the retention of UCMSC under static and dynamic conditions and thus offers a potential cell delivery system for the repair of the damaged myocardium.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation seitens der Technischen Universität München herzlichst danken. An dieser Stelle möchte ich zudem meinen speziellen Dank für die fortwährende Begleitung meiner akademischen Laufbahn aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Bruno Reichart gebührt großer Dank für die Möglichkeit der experimentellen Durchführung meiner Promotion in der Herzchirurgischen Klinik der Universität München.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. physiol. Günther Eißner, der die Arbeit während meiner gesamten Promotion hervorragend wissenschaftlich betreute und mir in biologischen Fragen jederzeit zur Seite stand. Für sämtliche, meine Arbeit betreffenden experimentellen Freiheiten sowie für die konstruktive Kritik bei der Verfassung von wissenschaftlichen Schriften möchte ich mich ebenso bedanken wie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr.-Ing. Bassil Akra bin ich für seine kompetente Beratung und seine selbstlose, tatkräftige Unterstützung in technischen Angelegenheiten äußerst dankbar.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Markus Eblenkamp für die hilfreichen, wegweisenden Informationen zur Erstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Interdisziplinäre Stammzellforschung und allen weiteren Mitarbeitern der Herzchirurgischen Klinik der Universität München für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Den studentischen Hilfskräften Michaela Marschmann und Simon Häussler danke ich für ihre zuverlässige Mitarbeit an diesem Dissertationsprojekt.

Weiterhin möchte ich der Fa. pfm medical titanium GmbH, der Fa. W. L. Gore & Associates sowie Frau Jasmin Gossmann (LMU München, Biozentrum Martinsried) für die produktive Zusammenarbeit danken.

Schließlich gilt meinen Eltern größter Dank, für ihre unermüdliche moralische und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit, die ohne ihren uneingeschränkten Rückhalt nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Herz	1
1.1.1	Anatomie.....	1
1.1.2	Physiologie des Herzmuskels.....	2
1.2	Myokardinfarkt - Koronare Herzerkrankung	3
1.2.1	Definition & Ursache	3
1.2.2	Pathophysiologie	4
1.2.3	Konventionelle Therapien	4
1.3	Kardiales Tissue Engineering	6
1.3.1	Zellapplikation	6
1.3.2	Zellquellen	7
1.3.3	Kardiomyogene Differenzierung.....	9
1.3.4	Zellträger.....	10
1.3.5	Bioreaktoren.....	14
2	Zielsetzung	16
3	Voruntersuchungen zum Implantat-Trägerwerkstoff	17
4	Methoden	18
4.1	Versuchsdesign	18
4.2	Kultivierung von UCMSC	19
4.2.1	Zellisolierung	19
4.2.2	Zellpassage.....	20
4.2.3	Kryokonservierung	21
4.3	Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC	21
4.3.1	Differenzierung nach Goumans et al.....	21
4.3.2	Differenzierung nach Maltsev et al.	22
4.3.3	Differenzierung nach Matsuura et al.	23
4.3.4	Differenzierung nach Wang et al.....	23
4.3.5	Differenzierung nach Wu et al.	23

4.4	<i>In vitro</i> Besiedelung von Zellträgern mit UCMSC	23
4.4.1	Zellen.....	23
4.4.2	Zellträger.....	24
4.4.3	Titanisierung von Zellträgern	24
4.4.4	Sterilisation von Zellträgern	25
4.4.5	Besiedelungstechnik zur statischen Analyse	25
4.4.6	Besiedelungstechnik für dynamische Beanspruchung	26
4.5	Entwicklung eines pulsatilen Bioreaktors	28
4.5.1	Konzeption	28
4.5.2	Konstruktion	28
4.5.3	Sterilisation.....	28
4.5.4	Sterilitätsprüfung.....	28
4.5.5	Funktionsprüfung.....	28
4.6	Analytik	29
4.6.1	Zellzählung	29
4.6.2	Durchflusszytometrie	29
4.6.3	Funktionelle Charakterisierung	30
4.6.4	Zellmarkierung	30
4.6.5	Vitalfärbung	31
4.6.6	Bestimmung der Proliferationskapazität	32
4.6.7	Rasterelektronenmikroskopie	33
4.6.8	Immunzytochemie	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Phänotypische Charakterisierung von UCMSC.....	35
5.1.1	Morphologie undifferenzierter UCMSC	35
5.1.2	Expressionsprofil von Oberflächenantigenen	35
5.1.3	Funktionelle Charakterisierung	36
5.2	Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC.....	38
5.2.1	Morphologie kardiomyogen differenzierter UCMSC	38
5.2.2	Expression kardialer Proteine.....	38
5.3	Besiedelung von Zellträgern <i>in vitro</i>.....	42
5.3.1	Anwachsrate nach statischer Besiedelung.....	42
5.3.2	Vitalität nach statischer Besiedelung.....	43
5.3.3	Proliferationskapazität nach statischer Besiedelung.....	44
5.3.4	Morphologie nach statischer Besiedelung.....	45

5.4	Bioreaktor-Konzeptstudie	47
5.4.1	Bioreaktor der 1. Generation	47
5.4.2	Bioreaktor der 2. Generation	48
5.4.3	Bioreaktor der 3. Generation	50
5.5	Bioreaktor-Sterilität.....	55
5.6	Bioreaktor-Funktionalität	55
5.7	Mechanische Belastbarkeit besiedelter Zellträger.....	56
5.7.1	Anwachsrate nach dynamischer Beanspruchung	56
5.7.2	Morphologie nach dynamischer Beanspruchung	57
6	Diskussion & Synopsis.....	59
6.1	Besiedelung von Zellträgern <i>in vitro</i>.....	59
6.2	Bioreaktor – Simulation des pulsierenden Herzens	60
6.3	Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC.....	62
7	Ausblick.....	64
	Abkürzungsverzeichnis.....	65
	Literaturverzeichnis	69
	Veröffentlichte Teile der Dissertation.....	79
	Anhang A: Besiedelungsuntersuchung von Explantaten	80
	Anhang B: Material.....	91
	Anhang C: Datenblatt Getriebemotor	96
	Anhang D: Datenblatt Steckernetzteil	97
	Anhang E: Datenblatt Drehzahlsteller	98
	Anhang F: Mikrobiologische Befunde.....	99

1 Einleitung

1.1 Das Herz

1.1.1 Anatomie

Das Herz des Menschen ist ein muskuläres Hohlorgan mit konischer Form und liegt innerhalb des Herzbeutels (Pericard) hinter dem Brustbein. Es wiegt im Durchschnitt 0,5 % des Körpergewichtes und wird von Herzkranzgefäßen mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Das gesunde Herz besteht aus zwei getrennten Hälften, die jeweils in rechten und linken Vorhof (Atrium) und rechte und linke Kammer (Ventrikel) untergliedert sind (siehe Abbildung 1.1). Zwischen Vorhöfen und Kammern befinden sich Herzklappen, die einen unidirektionalen Blutfluss gewährleisten [12].

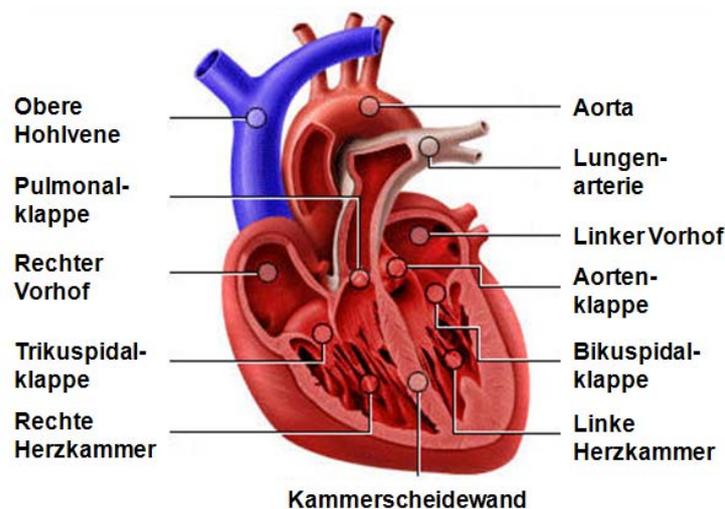


Abbildung 1.1. Anatomie des humanen Herzens [modifiziert von cholesterin.msd.de]. Das menschliche Herz besteht aus zwei Herzkammer, zwei Vorhöfen, und vier Herzklappen.

Die Herzwand besteht aus drei Schichten (siehe Abbildung 1.2). Die aus endokardialen Endothel und subendothelialen Bindegewebeschichten bestehende Herzinnenhaut (Endokard) kleidet die innere Oberfläche von Kammern und Vorhöfen vollständig aus, um eine Blutgerinnung zu verhindern. Die Herzaußenhaut (Epikard) besteht aus epikardialen Bindegewebe und bildet gleichzeitig das viszerale Blatt des Herzbeutels, wodurch eine reibungslose Bewegung des Herzens ermöglicht wird. Zwischen der Herzinnen- und Herzaußenhaut befindet sich der Herzmuskel (Myokard) [73]. Dieser erfüllt durch rhythmische Kontraktion mit etwa 70 Schlägen pro Minute (bpm) die Hauptaufgabe des Herzens, nämlich die Durchblutung und Versorgung sämtlicher Körperorgane mit Sauerstoff [129].

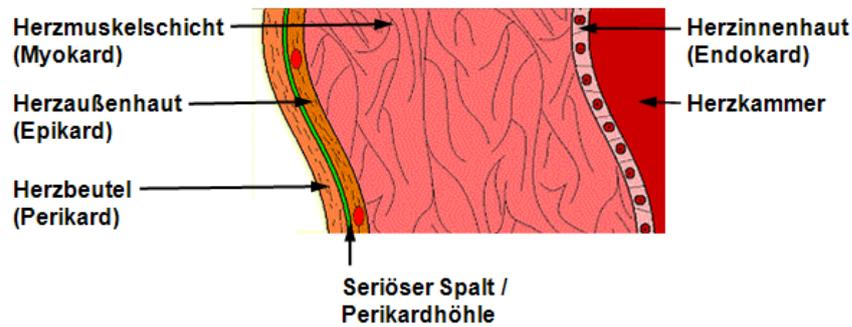


Abbildung 1.2. Aufbau der Herzwand [modifiziert von medizinfo.de]. Die Herzwand besteht aus der Herzinnenhaut, dem Herzmuskel und der Herzaußenhaut. Durch die Kontraktion des Herzmuskels wird die Sauerstoffversorgung sämtlicher Körperorgane gewährleistet.

1.1.2 Physiologie des Herzmuskels

Die Herzmuskulatur (siehe Abbildung 1.3) besteht histologisch aus einem dicken und einem dünnen Filament. Den Hauptbestandteil des dicken Filaments bildet Myosin. Myosin ist ein Motorprotein und essentiell für die Muskelkontraktion, bei der sich Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander verschieben. Der Hauptbestandteil des dünnen Filaments ist das Strukturprotein Aktin. Dieses ist in Form einer Doppelhelix angeordnet. Zwischen den Aktinfilamenten befinden sich die starren Moleküle des Tropomyosinproteins. Auf jedem Tropomyosinmolekül befindet sich ein Troponinkomplex, welcher spezifisch für Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) ist. Der Troponinkomplex besteht aus den drei Untereinheiten, Troponin C, Troponin I und Troponin T [74].

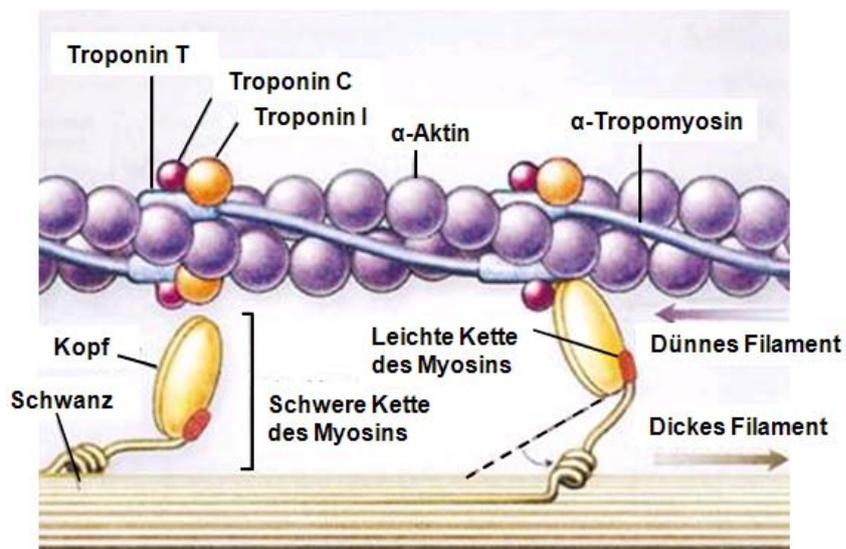


Abbildung 1.3. Aufbau des Herzmuskels [modifiziert nach edoc.hu-berlin.de]. Die kontraktile Einheiten des Herzens bestehen aus Aktin und Myosin-Filamenten die durch α -Aktinin stabilisiert und durch die Moleküle des Troponinkomplexes reguliert werden.

Troponin I und T bewirken die korrekte Anordnung von Aktin zu Tropomyosin. Troponin C ist zuständig für die Bindung von Kalziumionen. Durch die Bindung von Kalziumionen kommt es zur Konformationsänderung des Troponinkomplexes, dadurch werden Myosinbindungsstellen am Aktinmolekül frei, wodurch die enzymatisch aktiven Myosinköpfchen binden können. Dies führt zur Kontraktion des Muskels [74]. Damit sich die dazu notwendige Erregung ausbreiten kann, sind die einzelnen Kardiomyozyten über Kanäle aus Connexinen miteinander verbunden. Im humanen Herzmuskel kommen Connexin 40, 43 und 45 in unterschiedlicher Verteilung vor, wobei im Gegensatz zum Erregungsbildungssystem im Arbeitsmyokard fast ausschließlich Connexin 43 exprimiert wird [118].

1.2 Myokardinfarkt - Koronare Herzerkrankung

1.2.1 Definition & Ursache

Der Myokardinfarkt ist ein akutes und lebensbedrohliches Ereignis. Die Mehrzahl der Myokardinfarkte entsteht im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung. Diese ist eine durch Arteriosklerose verursachte chronische Erkrankung der Herzkranzgefäße, die im Verlauf von Jahren bis Jahrzehnten fortschreitet, meist ohne Symptome zu entwickeln [10,34]. Zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose zählen neben einer genetischen Prädisposition das Rauchen von Tabak, Übergewicht, Diabetes mellitus und Bluthochdruck [102]. Die Erkrankung beruht auf einer Anlagerung von Lipiden, Kohlehydraten, Kalzium und Blutbestandteilen (arteriosklerotischer Plaques, siehe Abbildung 1.4) an den Gefäßwänden, die zur Versteifung der Gefäßwand und zu einer Verengung des Gefäßlumens führt [72,103].

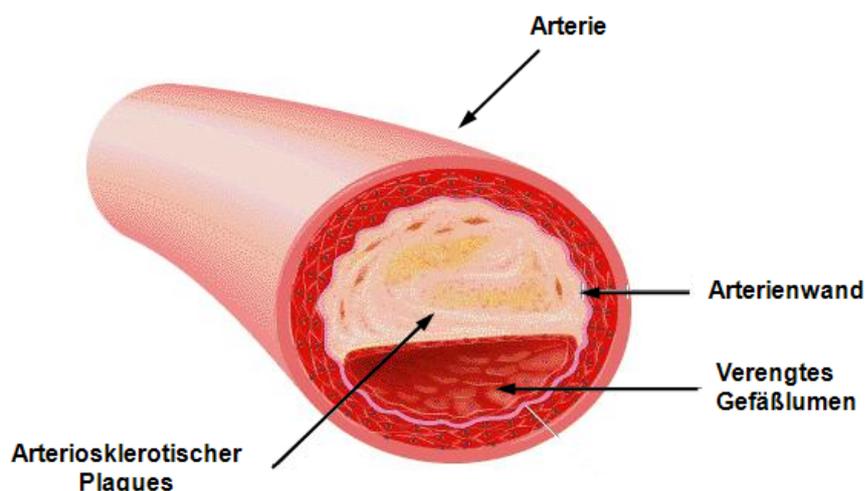


Abbildung 1.4. Arteriosklerotischer Plaques in einer Arterie [modifiziert von bg-stjohann.tsn.at]. Durch die Anlagerung von arteriosklerotischen Plaques in einem Herzkranzgefäß wird dessen Lumen verengt, woraus eine Sauerstoffunterversorgung der Herzmuskulatur resultiert.

1.2.2 Pathophysiologie

Die Folge eines arteriosklerotisch verengten Herzkranzgefäßes ist die Beeinträchtigung der Durchblutung und damit eine verminderte Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur (Ischämie). Mit Fortschreiten der Erkrankung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Myokardinfarkts [104,105]. Dabei kommt es zum Verschluss eines Herzkranzgefäßes durch ein Blutgerinnsel (Koronarthrombose), wodurch ein Teil des Herzmuskels nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird und abzusterben droht. Das Schicksal eines Infarktpatienten hängt im Wesentlichen von der schwer zu beeinflussenden Infarktgröße ab [35]. In Deutschland sterben jährlich ca. 60.000 Menschen an den Folgen eines akuten Myokardinfarkts [122]. Aufgrund einer raschen und effizienten Erstversorgung überleben jedoch viele Patienten die akute Phase des Infarkts.

Ausgeprägte Infarkte, bei denen ein großes Areal des Herzmuskelgewebes abstirbt, führen hingegen unweigerlich zu einer chronischen Herzinsuffizienz [69]. Entscheidend für die Entstehung einer Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt sind Umbau- und Anpassungsvorgänge im Myokard. Häufig kommt es hierbei zur Expansion des ursprünglichen Infarktgebietes. Durch Zellschädigung frei gesetzte Entzündungsmediatoren führen zur Einwanderung von Entzündungszellen in das Infarktgewebe. Es bildet sich Granulationsgewebe und vom Rand des Infarktgebietes sprossen Kapillaren in die Nekrose ein. Makrophagen bauen das Granulationsgewebe ab und Fibrozyten synthetisieren Kollagen, welches irreversibel geschädigte Kardiomyozyten ersetzt [15,68]. Es kommt zur Vernarbung des abgestorbenen Muskelgewebes. Das umgebende Myokard reagiert darauf mit Hypertrophie. Der dadurch erhöhte Sauerstoffbedarf kann nicht gedeckt werden. Durch die eintretende Ischämie folgt der Untergang weiterer Kardiomyozyten und somit eine Ausdehnung des Infarktbereiches [66,68]

1.2.3 Konventionelle Therapien

Die ersten Stunden eines Herzinfarktes sind für den Patienten von entscheidender Bedeutung. Therapieziel ist die möglichst rasche Eröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes zur Wiederherstellung der Durchblutung im Infarktgebiet, um die Infarktausdehnung zu begrenzen, die myokardiale Funktion zu verbessern und weitere Infarkte zu verhindern [47]. Dazu sind verschiedene Ansätze der Reperfusion des Myokards etabliert.

Die medikamentöse Lysetherapie mit thrombolytischen Agenzien zielt in der Akutsituation auf eine möglichst optimale Sauerstoffversorgung des Herzens und auf die Vermeidung weiterer Blutgerinnselbildung ab. Langfristig wird dies durch die Gabe von Acetylsalicylsäure, Betablockern, ACE-Hemmern sowie Statinen angestrebt [54].

Chirurgische Therapien beinhalten die katheterbasierte perkutane transluminale Koronarangiografie (PTCA, siehe Abbildung 1.5 A) mit und ohne Stentimplantation zur mechanischen Öffnung des Gefäßes [5,46,59]. Ist eine minimal-invasive Intervention nicht möglich, besteht die Möglichkeit einer Bypasslegung (siehe Abbildung 1.5 B) zur Überbrückung des verschlossenen Herzkranzgefäßes [5,25]. Des Weiteren stellt die Endarteriektomie (siehe Abbildung 1.5 C) durch Entfernung des arteriosklerotischen Plaques, eine gängige Methode zur Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes dar [5,47]. Alle derzeit verfügbaren Therapiemöglichkeiten sind allerdings durch das Auftreten von Restenosen und daraus resultierenden Thrombosen und Hyperplasien limitiert [5,47].

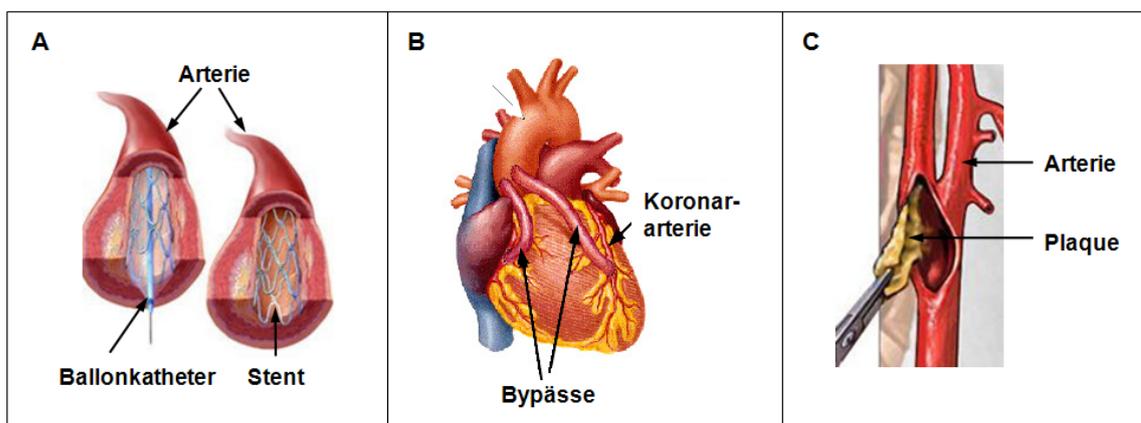


Abbildung 1.5. Chirurgische Interventionen zur Myokard-Reperfusion. Perkutane transluminale Koronarangiografie [modifiziert von citizendum.org] (A), Bypasslegung [modifiziert von mtec.or.th] (B), Endarteriektomie [modifiziert von vascularcarecentre.com] (C).

Ischämisch induzierte, strukturelle Veränderungen, wie sie im Spätstadium der Herzinsuffizienz auftreten, sind irreversibel und daher einer Therapie unzugänglich. Demzufolge ist eine frühzeitige Intervention mit der Zielsetzung der Regeneration und damit der funktionellen Wiederherstellung des geschädigten Herzmuskelgewebes von zentraler klinischer Bedeutung. Trotz verbesserter pharmakologischer und interventioneller Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose von Patienten mit ventrikulären Funktionsstörungen schlecht [35]. Im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz bleibt als letzte Therapieoption oft nur die Herztransplantation. Der Bedarf an Spenderherzen übersteigt jedoch bei Weitem deren Verfügbarkeit [56]. Statistiken der Eurotransplant International Foundation zufolge, wurde der Bedarf an Spenderherzen im Jahr 2009 nur zu 37 % gedeckt. Die Herstellung von künstlichem Herzmuskelgewebe, das sogenannte kardiale Tissue Engineering, kann daher eine sinnvolle Alternative zur Herztransplantation sein.

1.3 Kardiales Tissue Engineering

Das kardiale Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet der regenerativen Medizin. Ziel ist die Wiederherstellung erkrankter kardialer Strukturen durch *in vitro* generiertes Gewebe und Stimulation körpereigener Regenerationsprozesse mittels autologer sowie allogener Zellen [70,120].

1.3.1 Zellapplikation

Eine der zentralen Fragen im kardialen Tissue Engineering ist die Art der Verabreichung autologer bzw. allogener Zellen, wobei grundsätzlich zwischen zwei Vorgehensweisen unterschieden wird.

Zelluläre Kardiomyoplastie

Bei dieser Methode erfolgt eine Applikation von Einzelzellen entweder durch intrakoronare Injektion oder durch direkte Implantation in das Myokard [60]. Im Tiermodell wurde dadurch eine Steigerung der Pumpfunktion des Herzens gezeigt, allerdings konnte eine Regeneration des abgestorbenen Herzmuskels nicht nachgewiesen werden [92]. Die festgestellte Funktionsverbesserung wird daher auf eine Sekretion bzw. Stimulation angiogener Wachstumsfaktoren zurückgeführt, so dass keine Anregung der Myogenese und damit keine Verbesserung der Kontraktilität erfolgt [24]. Eine systemische Gabe birgt zudem das Risiko einer pulmonalen Akkumulation der Stammzellen. Die lokale Injektion von Einzelzellen gewährleistet zwar deren Präsenz in der ischämischen Region, jedoch liegt der initiale Zellverlust dieser Methode bei 90-95 % [14,60].

Gewebeersatztherapie

Durch *in vitro* generiertes Herzmuskelgewebe bietet dieser Ansatz die Perspektive, Gewebedefekte mit einem bereits vor Transplantation geometrisch, strukturell und funktionell definiertem Gewebeäquivalent zu rekonstruieren. Dazu werden Zellträger *in vitro* mit Zellen besiedelt und auf das Infarktareal implantiert um neben einer Stützfunktion eine präzise Zellapplikation zu erreichen [30,157]. Residuelle, kardiale Stammzellen sollen durch Migration der implantierten Zellen in das geschädigte Myokard mittels freigesetzter Wachstumsfaktoren zur Regeneration stimuliert werden. Ebenso denkbar ist die Wiederherstellung des Herzmuskelgewebes durch die applizierten Zellen an sich, welche *in vivo* unter dem Einfluss lokaler gewebespezifischer Mechanismen in Richtung Kardiomyozyten differenzieren bzw. bereits vor Transplantation *in vitro* in Richtung Kardiomyozyten differenziert wurden [61]. Bei der Verwendung von artifiziell Herzmuskelgewebe ist gegenüber der systemischen Zellapplikation von einem weitaus geringerem Zellverlust auszugehen, da die Zellen durch Adhäsionsmoleküle auf dem Zellträger immobilisiert sind [61].

Zur Regeneration des Myokards wurden bereits Zellen aus diversen Zellquellen wie beispielsweise aus dem Skelettmuskel [127] oder dem neonatalen Rattenherzen [158] untersucht. Obwohl sich einige Zelltypen ins geschädigte Myokard integrieren, ist deren Verwendung durch ihre begrenzte Verfügbarkeit und geringe Proliferationskapazität limitiert [67]. Als Grundlage einer gezielten Geweberegeneration resultiert daraus die Suche nach neuen geeigneten Zellpopulationen.

1.3.2 Zellquellen

Voraussetzung für die Wiederherstellung von Herzmuskelgewebe ist die Fähigkeit von Zellen zur funktionellen Eingliederung in den Gewebsverband, Proliferation und Differenzierungsfähigkeit (Plastizität) [156]. Wie vielfach in der Literatur beschrieben, werden Stammzellen diesen Ansprüchen gerecht [6,80,117]. Je nach Herkunft der Stammzellen unterscheidet man embryonale, induzierte und adulte Stammzellen [145].

Embryonale Stammzellen

Stammzellen aus dem frühen Embryo sind gut expandierbar und haben das Potential, sich in jegliches Gewebe entwickeln zu können. Diese Fähigkeit bezeichnet man als Pluripotenz. Vor allem durch ihr hohes Differenzierungspotential wären embryonale Stammzellen für therapeutische Anwendungen nahezu ideal, allerdings bestehen ethische und rechtliche Bedenken bei der Verwendung von Embryonen zur Gewinnung von Stammzellen. Darüber hinaus sind im Tierversuch Teratokarzinome nach Implantation von embryonalen Stammzellen beschrieben worden [33,131].

Induzierte pluripotente Stammzellen

Als ethisch unbedenkliche Alternative zu embryonalen pluripotenten Stammzellen gelten induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) [41]. Seit der Entdeckung, dass adulte Fibroblasten durch genetische Manipulation zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden können [125,126], wird intensiv nach Methoden gesucht, diesen Ansatz für einen klinischen Einsatz vorzubereiten. Ein erster Schritt in dieser Richtung ist die erfolgreiche Reprogrammierung von Fibroblasten mittels rekombinanter Proteine [155]. Die potentielle kardiomyogene Differenzierbarkeit dieser Protein-induzierten pluripotenten Stammzellen (p-iPSC) stellt somit eine weitere Option für das kardiale Tissue Engineering dar.

Adulte Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen (Blutstammzellen) und mesenchymale Stammzellen (Bindegewebsstammzellen) von Säuglingen, Kindern und Erwachsenen werden kollektiv als adulte Stammzellen bezeichnet. Als Synonym für adulte Stammzellen wird zunehmend auch die Bezeichnung postnatale Stammzelle verwendet, insbesondere dann, wenn von Stammzellen des kindlichen und frühkindlichen Organismus gesprochen wird [3].

Die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ist ein vielversprechender

Ansatz zur Geweberegeneration. MSC sind adhärente, Fibroblasten-ähnliche Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Gewebe mesenchymalen Ursprungs wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten [55]. Die Verwendung von MSC erscheint gegenüber der Verwendung von adulten hämatopoetischen oder embryonalen Stammzellen für die Gewebeersatztherapie vorteilhaft, da MSC neben einer vergleichbaren Pluripotenz und Differenzierungsfähigkeit auch starke pro-angiogenetische Eigenschaften besitzen, eine Funktion, die für ein funktionelles Myokard unerlässlich ist [96]. Zudem sind MSC von geringerer Immunogenität, so dass eine Immunsuppression nur bedingt erforderlich ist [71]. Hinzu kommt die Differenzierbarkeit von MSC zu funktionellen Kardiomyozyten [113]. Darüber hinaus weisen MSC eine höhere Migrationskapazität an Orte von Gewebeschäden auf [106], an denen sie reparierende Wachstumsfaktoren produzieren können [64]. Schließlich lassen sie sich besser kryokonservieren als hämatopoetische Stammzellen [96], was einen unmittelbaren klinischen Einsatz bei akuten Läsionen ermöglicht. Derzeit ist das Knochenmark die häufigste Quelle für therapeutisch verwendete MSC, allerdings ist dessen Entnahme nur durch einen invasiven Eingriff möglich. Zudem verringert sich die Anzahl sowie das Differenzierungspotential von knochenmarkstämmigen MSC mit zunehmenden Alter des Spenders [111,138].

In diesem Zusammenhang gilt die Nabelschnur (siehe Abbildung 1.6 A) als vielversprechendes, alternatives Stammzellreservoir [37]. Die zwei Arterien und eine Vene der bis zu 60 cm langen Nabelschnur werden von fetalem Bindegewebe, der sogenannten Wharton'schen Sulze umgeben (siehe Abbildung 1.6 B). Dieses Stroma schützt die Gefäße der Blut-, Sauerstoff- und Nährstoffversorgung vor Kompression, Torsion und Biegung [90]. Weiss et al. berichten in Übereinstimmung mit mehreren Publikationen von mesenchymalen Stammzellen in der perivaskulären und intervaskulären Region der Wharton'schen Sulze [86,101,140,141].

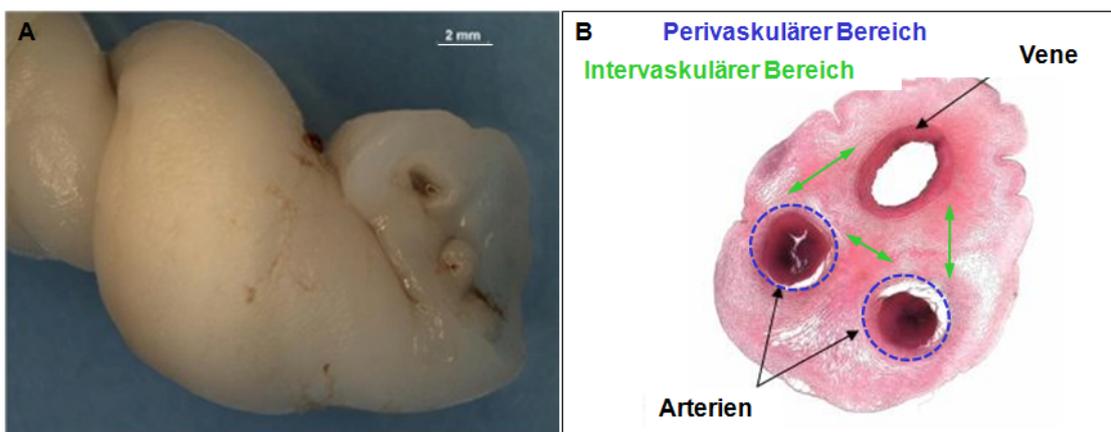


Abbildung 1.6. Native Nabelschnur (A). Querschnitt einer Nabelschnur (B). Die zwei Arterien und eine Vene der Nabelschnur werden von der Wharton'schen Sulze umgeben, wobei sowohl die perivaskuläre als auch die intervaskuläre Region der Wharton'schen Sulze mesenchymale Stammzellen beinhaltet [modifiziert von [37]].

Mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) haben gegenüber MSC, beispielsweise aus dem Knochenmark, den Vorteil, leicht zugänglich zu sein und sich einfach isolieren zu lassen [110]. Aufgrund der engen Beziehung zur Fetalphase ist davon auszugehen, dass UCMSC geringer determiniert sind als Zellen des Erwachsenen, ein geringeres teratogenes Potential aufweisen sowie frei von Viren sind [86,139]. Zudem besitzen UCMSC auch nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen eine höhere Proliferationsrate als knochenmarkstämmige MSC [86,137]. Darüber hinaus verfügen sie neben einer potentiell höheren tolerogenen Kapazität über ein höheres Differenzierungspotential insbesondere in Richtung Kardiomyozyten [9,132,146].

1.3.3 Kardiomyogene Differenzierung

Das Hauptziel kardialer zelltherapeutischer Maßnahmen ist die Repopulation des geschädigten Myokards mit Zellen zur Wiederherstellung der Kontraktilität [78,97,119,121].

Das kardiomyogene Differenzierungspotential knochenmarkstämmiger MSC sowie eine signifikante Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels nach deren Applikation wurde bereits mehrfach publiziert [43,75,108]. Nachdem undifferenzierte MSC *in vivo* spontan in multiple Zelltypen zu differenzieren vermögen, besteht allerdings die Möglichkeit der Maldifferenzierung mit potentiell lebensbedrohlichen Konsequenzen, wie beispielsweise die osteogene Differenzierung von MSC des Knochenmarks innerhalb des ischämischen Myokards zeigt [19].

Wenngleich derartige Phänomene für UCMSC bislang nicht beschrieben sind [132], wird durch vorgenannte negative Beobachtung postuliert, dass eine kardiomyogene Differenzierung im Vorfeld der Transplantation eine Regeneration des Herzmuskels unterstützt und dadurch die Herzfunktion wiederherstellt [81]. In diesem Zusammenhang wird versucht, die Transformation von Stammzellen in Richtung Kardiomyozyten durch Kultivierung unter definierten Bedingungen zu induzieren [65].

5-Azazytidin [49,136,146], Oxytocin [83], die Generierung sogenannter „embryoid bodies“ [77] und einige Wachstumsfaktoren wie der transforming-growth-factor- β 1 (TGF- β 1) [49], platelet-derived-growth-factor (PDGF) sowie der basic-fibroblast-growth-factor (bFGF) [146] werden zur Induktion der kardiomyogenen Differenzierung verschiedener Stammzelltypen verwendet.

Durch DNA-Methylierung in der Zelle bewirkt das Zytostatikum 5-Azazytidin das An- und Abschalten bestimmter Gene, woraus nach einem bislang noch unbekanntem Mechanismus eine kardiomyogene Differenzierung resultiert [45]. Nach einem ebenfalls ungeklärten Mechanismus ist die Induktion der kardiomyogenen Differenzierung von embryonalen P19 Karzinomzellen sowie adulten Sca-1+ Zellen des murinen Herzens mittels des Fortpflanzungshormons Oxytocin beschrieben [83,93]. In diesem Kontext ist die Existenz eines Oxytocin/Oxytocin-Rezeptor Signalweges im Herzen und die höhere Expression des Oxytocin-Rezeptors in sich entwickelnden

Herzen bekannt. Dies deutet wiederum auf eine spezifische Beteiligung von Oxytocin am Zellwachstum wie auch bei der Differenzierung von Kardiomyozyten hin. [40]. Die Aggregation von embryonalen Stammzellen führt zu der Bildung von „embryoid bodies“ mit regionaler Differenzierung von Zelltypen, die sich deutlich von embryonalen Stammzellen unterscheiden. Während der Reifung *in vitro* unterliegen embryonale Stammzellen dabei massiven Änderungen in der Morphologie und weisen zahlreiche molekulare Marker differenzierter Zelltypen auf [58]. Maltsev et al. berichten unter Verwendung dieses Kultivierungssystems von der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten [77]. Durch den Zusatz ausgewählter Wachstumsfaktoren wird zudem versucht, sich kardialen *in vivo* Bedingungen anzunähern. TGF- β und bFGF zählen dabei zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren der Kardiogenese und beeinflussen Zellproliferation, Migration sowie Differenzierung während der Embryonalentwicklung [52].

Es wird vermutet, dass die kardiomyogene Differenzierung durch eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-4 ausgelöst wird [128]. GATA-4 gehört zur Familie der GATA – Transkriptionsfaktoren, welche wichtige Funktionen bei der embryonalen Entwicklung übernehmen. Das GATA-4 Protein ist nicht nur für die Entwicklung des Herzens wichtig, sondern stellt gleichzeitig einen der frühesten kardialen Marker dar [148]. Im adulten Herzen steuert es die Expression vieler sarkomerischer Proteine, worauf neben den Proteinen des Troponinkomplexes die Verifizierung induzierter Kardiomyozyten basiert [26]. Für eine synchrone Kontraktion ist zudem deren elektrische Verbindung durch Kanäle aus Connexinen essentiell [118]. Eine Kontraktion kardiomyogen differenzierter Stammzellen embryonaler wie auch adulter Herkunft konnte bereits *in vitro* beobachtet werden, allerdings handelt es sich dabei nur um einen geringen Prozentsatz kontrahierender Zellen von weniger als 10% [16,152,159].

1.3.4 Zellträger

Es ist bekannt, dass isolierte Zellen in der Regel nicht selbständig neues Gewebe formen können [151]. Um Gewebe *in vitro* herzustellen, müssen daher die jeweiligen Zellen auf einer natürlichen oder artifiziellen Matrix, dem Zellträger, angesiedelt werden. Nur wenn Zellen und Zellträger optimal interagieren, kann sich daraus funktionelles Gewebe entwickeln. Die Auswahlkriterien eines geeigneten Zellträgers sind vielfältig und sollten in Übereinstimmung mit der vorgesehenen Anwendung getroffen werden. Um eine Zellanheftung, Zellwanderung auf oder in die Matrix, Zellproliferation und –differenzierung zu ermöglichen, muss ein Zellträger eine auf den Zelltyp abgestimmte stoffliche Zusammensetzung, Architektur und Oberflächenstruktur aufweisen. Zudem muss der Zellträger die Voraussetzung erfüllen, dass Zellen ihren Phänotyp erhalten und erforderliche Proteine synthetisieren können [135]. Zur Vermeidung von Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen nach Implantation muss der verwendete Zellträger biokompatibel und sterilisierbar sein. Bei der Generierung von

Herzmuskelgewebe muss der Zellträger darüber hinaus aus flexiblem und zugleich reißfestem Material bestehen, damit sich die entstehenden Strukturen kontrahieren können [91,143]. Derzeit werden natürliche, synthetische oder hybride Materialien auf deren Eignung als potentielle Zellträger untersucht [2,85,142].

Natürliche Materialien

- **Dezellularisiertes Gewebe**

Diese biologischen Materialien sind entweder allogener oder xenogener Herkunft und werden enzymatisch oder durch Detergenzien dezellularisiert [124]. Beispielhaft lässt sich hierfür die Dezellularisierung von Segmenten der Harnblase anführen. Die zellfreien Gewebe bestehen vollständig aus natürlicher extrazellulärer Matrix (ECM), degradieren nach Implantation und werden durch ECM-Proteine transplantiertes oder einwachsender Zellen ersetzt [8]. Aufgrund hervorragender mechanischer Eigenschaften werden dezellularisierte Gewebe bei der Entwicklung von vitalen Herzklappenprothesen verwendet [120]. Die Dezellularisierung kann das Gewebe allerdings auch schädigen und zu einer Verminderung der Zugfestigkeit und Elastizität führen. Dezellularisierte Gewebe xenogener Herkunft können die Bildung von Aneurysmen begünstigen und zu Infektionen sowie Thrombosen führen. Zudem kann nach Dezellularisierung eine verbleibende Antigenität des Gewebes die Besiedelung beeinträchtigen [17,57,124].

- **Biopolymere**

Beispiele für natürliche Polymere sind Fibrin, Kollagen, Chitin, Hyaluronsäure und Alginate. Neben einer enzymatischen Degradation weisen diese Materialien eine geringe pro-inflammatorische Aktivität und Toxizität auf [135]. Zudem fördern sie aufgrund ihres hohen Proteingehalts das Zellwachstum auf Implantaten und bewirken durch ihre verstärkte Haftung am Empfängerorgan eine Beschleunigung des Heilungsprozesses [159].

Fibrin ist Bestandteil von Blutgerinnseln und spielt eine zentrale Rolle in der Wundheilung. Alternativ zu herkömmlichem Nahtmaterial wird Fibrinklebstoff bereits als Wundverschluss klinisch eingesetzt [57]. Ein weiteres Beispiel bereits klinisch verwendeter Biopolymere ist Kollagen. Es ist das vorherrschende Protein im menschlichen Körper und ist in den meisten Geweben der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Kollagen ist ein faserförmiges Protein mit einer starren, dreifach helikalen Struktur, wobei Typ I überwiegend in Haut und Knochen, Typ II in Knorpel und Typ III in Blutgefäßwänden vorliegt [57,135]. In der kardiovaskulären Chirurgie wird Kollagen als Herzklappen- und Blutgefäßsubstitut verwendet. Zudem findet es Anwendung beim Knochenersatz sowie bei der Behandlung von Verbrennungen und Geschwüren [143].

Obwohl natürlich vorkommende Biomaterialien dem nativen zellulären Milieu ähneln, ist eine weitreichende Applikation durch herkunftsbedingte, chargenabhängige Schwankungen limitiert. Zudem wird die Handhabung von Biopolymeren durch deren geringe mechanische Festigkeit erschwert. Die Denaturierung biologischer Polymere kann darüber hinaus von Patient zu Patient variieren und gegebenenfalls anwendungsabhängig eine chemische Modifizierung erfordern, die wiederum zu toxischen Effekten führen kann [135,150]

Synthetische Materialien

- Degradable Polymere

Viele synthetische, degradable Polymere wie Poly(α -hydroxy ester), insbesondere Polyglycolsäure (PGA) oder Polylactidsäure (PLA), Polyanhydride, Polyorthoester, und Polyphosphazene wurden entwickelt, um die vorgenannten Limitationen natürlicher Materialien zu umgehen [150]. Synthetische degradable Polymere besitzen die Eigenschaft, sich während der Kultur mit Zellen oder nach Implantation aufzulösen und dabei durch neu gebildete gewebespezifische ECM ersetzt zu werden. Die meisten dieser Polymere sind gegenüber enzymatischen Prozessen unempfindlich und werden chemisch hydrolysiert, so dass keine patientenabhängige Degradation zu erwarten ist [57,150]. Mikrostruktur, mechanische Eigenschaften sowie Resorptionsrate können durch die chemische Zusammensetzung kontrolliert werden, um eine Gewebekonstruktion und damit verbundene Umbauvorgänge zu ermöglichen. Zudem können synthetische degradable Polymere initial die mechanische Funktion des Implantates erfüllen, bis entsprechende Mengen ECM gebildet wurden [57]. Erfolgt allerdings der Abbau des Polymers schneller als die Bildung der ECM führt dies zu einem vollständigen Zellverlust wodurch ein therapeutischer Effekt ausgeschlossen ist. Des Weiteren setzen alle Polyester Degradationsprodukte frei, welche die Biokompatibilität beeinträchtigen können. Polyester sind darüber hinaus starre Materialien, wodurch deren Verwendung in lasttragenden Implantaten zwar vorteilhaft ist, in Weichgeweben wie dem Herzmuskel erscheint der Einsatz aufgrund unzureichender Flexibilität allerdings nachteilig.

- Nicht-degradable Polymere

Synthetisch hergestellte Polymere zeichnen sich durch ihre strukturelle Festigkeit, einer besonderen Oberflächenbeschaffenheit und einer dreidimensionalen Form mit einer definierten Porosität aus. Polyethylen terephthalat (PET, Dacron®, siehe Abbildung 1.7 A), Polyurethan (PU, siehe Abbildung 1.7 B), sowie expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE, siehe Abbildung 1.7 C) werden als synthetische, nicht degradable Polymere klassifiziert und dominieren den Implantatmarkt [94].

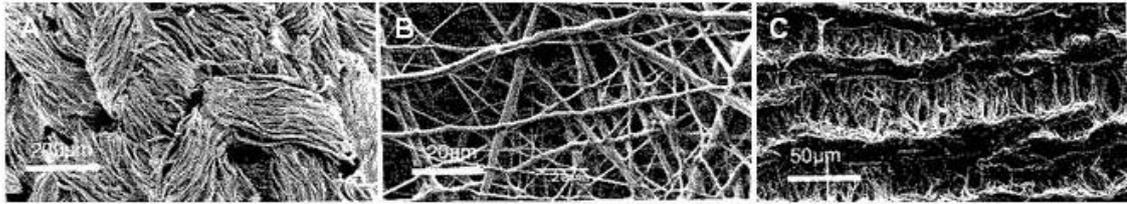


Abbildung 1.7. Mikrostruktur synthetischer, nicht-degradabler Polymere. PET-Fasern sind in Bündeln angeordnet, die wiederum ineinander verflochten sind (A), PU-Fasern sind ungerichtet angeordnet und haben einen Durchmesser von 200 nm bis 3 µm (B). Die Fasern von ePTFE werden durch Knotenpunkte miteinander verknüpft, die durchschnittlich 50 µm voneinander entfernt sind (C) [94].

PET ist ein teilkristalliner aromatischer Polyester aus gewebten oder gestrickten multiplen Fasern die in Bündeln miteinander verflochten sind. Während gewebte Prothesen aus PET kleine Poren besitzen, weisen gestrickte Prothesen größere Poren auf, um das Einwachsen von Gewebe zu unterstützen. PET findet vorwiegend als Werkstoff für künstliche Blutgefäße, Sehnen- und Bänderersatz sowie als Nahtmaterial Anwendung [142,143]. PU ist ein Polymer mit einer charakteristischen Urethangruppe. In der Monomereinheit können bestimmte Reste durch unterschiedliche Gruppen substituiert werden, woraus eine Vielfalt verschiedener Eigenschaften resultiert. Die Herstellung von hydrolytisch stabilen PU führte zur Entwicklung von unterschiedlichen Implantaten wie beispielsweise Gefäßimplantaten, künstlichen Herzklappen und Kathetern [142,143]. PTFE ist ein unverzweigtes, linear aufgebautes Polymer aus Fluor und Kohlenstoff. Das nach Expansion entstehende expandierte PTFE (ePTFE) weist eine fibrilläre Struktur aus Teflonknoten auf, zwischen denen sich Fibrillen mit internodalen Abständen von 17 µm bis 90 µm in Längsrichtung ausspannen. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus der Monomereinheit erreicht der Kristallinitätsgrad Werte von bis zu 94 %, wodurch das Polymer nicht degradiert. Neben der einfachen Verfügbarkeit weist ePTFE zudem nicht-immunogene und anti-thrombotische Eigenschaften auf. In der Medizin findet ePTFE vor allem Anwendung in kardialen, Leisten- und Gefäßimplantaten. Die Verwendung synthetischer nicht-degradabler Polymere, insbesondere von PET und ePTFE, als Zellträger ist allerdings durch deren mangelnde Besiedelbarkeit limitiert. Aufgrund der geringen Oberflächenenergie dieser hydrophoben Polymere resultieren eine mangelnde Benetzbarkeit und damit eine unzureichende Besiedelbarkeit [143].

Hybride

Hybride kombinieren die Vorteile verschiedener Materialien in einem Verbundwerkstoff. Um die Benetzbarkeit und damit die Besiedelbarkeit nicht-degradabler Polymere zu steigern, bietet sich die Möglichkeit der Oberflächenmodifikation an. Die Kenntnis über eine verbesserte Adhäsion und Reifung von Zellen auf positiv geladenen Oberflächen führte zu der Untersuchung diverser adhäsiver Beschichtungen auf synthetischen Materialien [130]. Die dazu verwendeten Substanzen wie Albumin, Kollagen, Fibrin, Gelatine, Fibronectin und Laminin binden

dabei direkt an spezifische Domänen der Zellmembran [25,134].

Beispielsweise beschichteten Kaehler et al. vaskuläre Prothesen aus ePTFE mit einem Fibronectin-Kollagen-Gemisch und berichten in Übereinstimmung mit Feugier et al. von einer ausgezeichneten Adhärenz und Proliferation endothelialer Zellen [42,62]. Beschichtungen mit spezifischen Adhäsionsproteinen verbessern zwar die Zelladhäsion, allerdings ist deren Unversehrtheit unter mechanischer Belastung gefährdet [63]. Ist die beschichtete Oberfläche zudem nicht vollständig besiedelt, werden durch diese Adhäsionsproteine Thrombozyten gebunden und es resultiert eine unerwünschte thrombogene Oberfläche [18].

Um die Einschränkungen biologischer Beschichtungen zu umgehen, kann eine hydrophile Oberfläche auf synthetischen Materialien durch Titanisierung mittels chemischer Gasphasenabscheidung unter Verwendung von Plasmaenergie (Plasma Activated Chemical Vapour Deposition, PACVD) erzielt werden [94]. Die Beschichtung weist aufgrund der kovalenten Bindung zum synthetischen Substrat eine sehr hohe Haftfestigkeit auf, wodurch diese nur durch Zerstörung des titanisierten Materials an sich gespalten werden kann. Die Schichtdicken der Titanisierung liegen zwischen 30 nm und 50 nm, so dass Oberflächenstruktur und Flexibilität trotz vollständig beschichteter Implantatoberfläche erhalten bleiben. Aufgrund der hohen Duktilität der Titanisierung bleibt die Beschichtung bei mechanischer Beanspruchung wie Verformung oder Dehnung intakt. Unter atmosphärischen Bedingungen oxidieren Oberflächen aus Titan und bilden eine Titandioxid-Schicht mit einer erhöhten Oberflächenenergie. Die Folge ist eine hervorragende Biokompatibilität und Benetzbarkeit des Materiales, so dass die Adhäsion von Zellen ermöglicht wird [20,143]. Titan und Titanlegierungen werden daher als Werkstoffe in Verbindung mit Gewebe, Knochen und Blut bereits häufig eingesetzt [109,123,147].

1.3.5 Bioreaktoren

Für den Einsatz von Gewebesubstituten *in vivo* ist es zunächst essentiell, die Funktionalität und die mechanische Widerstandsfähigkeit besiedelter Zellträger vor Transplantation *in vitro* zu untersuchen [88]. Darüber hinaus wird die zelluläre Differenzierung durch Kräfteinwirkungen, die entweder direkt auf die Zellen wirken oder indirekt über den Zellträger vermittelt werden, beeinflusst. [143]. Zellen werden *in vivo* fortwährend durch mechanische, elektrische und chemische Signale stimuliert, die deren Phänotyp, Morphologie und Proliferation beeinflussen. Sind diese Signale unpassend oder nicht vorhanden, verlieren Zellen ihrer Fähigkeit zu proliferieren und organisiertes Gewebe zu bilden [11,13]. In diesem Zusammenhang spielen Bioreaktoren zur Simulation physiologischer Bedingungen eine entscheidende Rolle [88].

Die Herstellung eines effektiven Bioreaktors erfordert die Berücksichtigung verschiedener Parameter. Idealerweise gewährleisten Bioreaktoren neben der Regulierung physikalischer Parameter wie Temperatur, pH, pO₂, pCO₂, die Nährstoffversorgung und Beseitigung toxischer Metaboliten sowie mechanische

Stimuli. Zudem muss das Material mit dem Herstellungsprozess, der Sterilisationstechnik und dem zu kultivierenden Zelltyp kompatibel sein [112]. Bioreaktoren können unter anderem nach ihrer Anwendung unterschieden werden. Einige Bioreaktoren dienen ausschließlich der Besiedelung und Kultivierung von Zellträgern, während andere Bioreaktoren beispielsweise zur Konditionierung verwendet werden [13,28,48]. Der Einsatz von Bioreaktoren zur erfolgreichen Gewebekonstruktion unter dynamischen Kulturbedingungen wurde bei der Herstellung von Herzklappen bereits mehrfach gezeigt [36,38,87]. Zur Verbesserung der kontraktile Eigenschaften artifizieller Herzmuskelkonstrukte ist die elektrische Feldstimulation sowie die mechanische Stimulation durch unidirektionales oder auxotonisches Dehnen beschrieben [21]. Zimmermann et al. berichten dabei von hoch differenzierten kardialen Gewebekonstrukten nach zyklischer Mechanostimulation [159].

2 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, das Potential von humanen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe für therapeutische Zwecke zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf der Entwicklung eines kardialen Implantates mittels Tissue Engineering zur Therapie von kardiomyodegenerativen Erkrankungen.

Gemäß dieser Zielsetzung ergab sich die Aufgabe der Etablierung einer Strategie zur Herstellung eines funktionellen Implantates. Dazu wurden verschiedene Materialien auf ihre Eignung als potentieller Zellträger untersucht. Vergleichende Kriterien waren dabei die Anwachsrate, Vitalität, Proliferation und Morphologie von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe unter statischen Bedingungen sowie nach dynamischer Beanspruchung. Zur Simulation der dynamischen Beanspruchung von besiedelten Zellträgern am pulsierenden Herzen, wurde ein pulsatiler Bioreaktor entwickelt. Zudem wurde die kardiomyogene Differenzierbarkeit von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe durch systematischen Vergleich verschiedener Differenzierungsprotokolle anhand der Expression spezifischer kardialer Proteine untersucht.

3 Voruntersuchungen zum Implantat-Trägerwerkstoff

Zur Klärung der *in vivo*-Besiedelbarkeit des Trägerwerkstoffes wurde eine Besiedelungsanalyse von explantierten kardialen Implantaten aus expandierten Polytetrafluorethylen (ePTFE) durchgeführt. Die Implantate wurden zur Therapie des Hypoplastischen Linksherzsyndroms (HLHS) eingesetzt und *ex vivo* auf eine generelle Besiedelung sowie auf eine Endothelialisierung im Besonderen untersucht. Die Analyse umfasste dabei eine immunhistologische Aufarbeitung der Explantate zur Detektion von Desoxyribonukleinsäuren und des endothelspezifischen von Willebrand-Faktors sowie eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zur morphologischen Beurteilung einer potentiellen zellulären Besiedelung. Eine vollständige wissenschaftliche Abhandlung zur Besiedelungsuntersuchung von Explantaten ist dem Anhang A zu entnehmen.

4 Methoden

4.1 Versuchsdesign

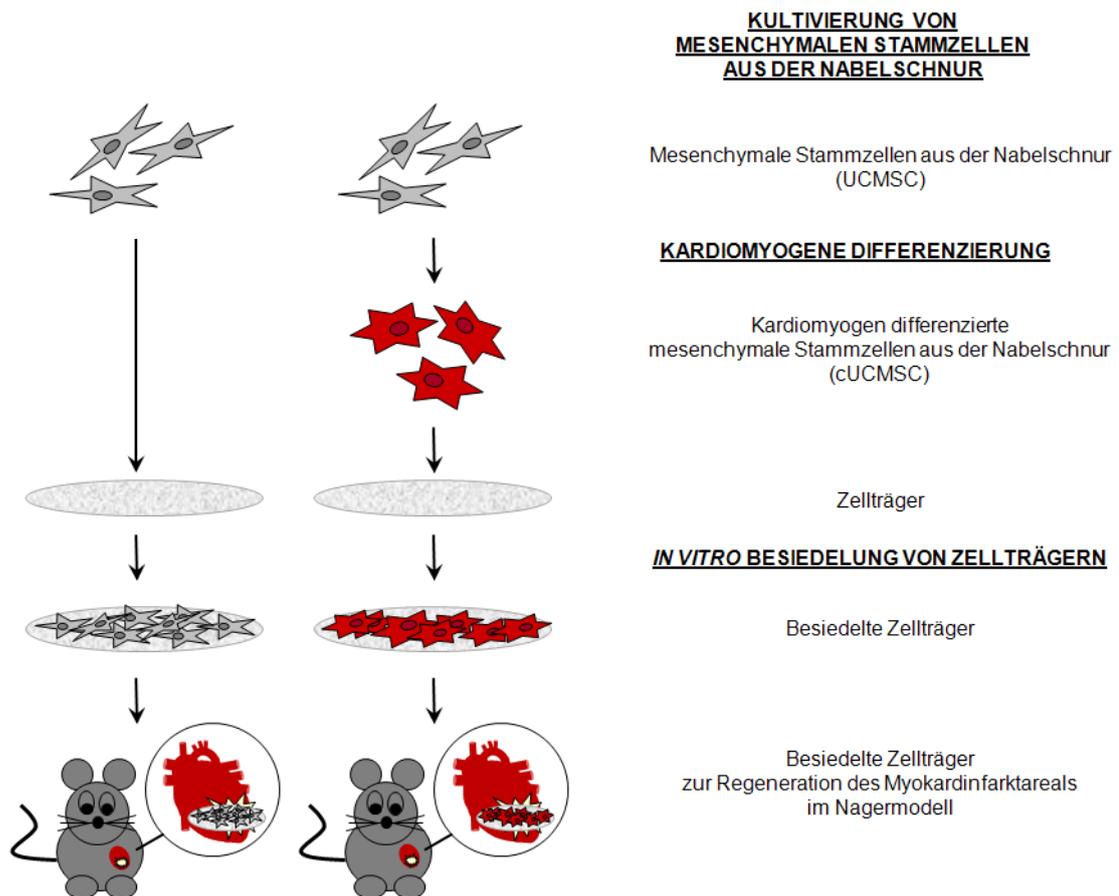


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung des Versuchsdesigns zur Myokardregeneration im Nagermodell. Mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur sollen undifferenziert (UCMSC) und kardiomyogen differenziert (cUCMSC) auf synthetische Zellträger aufgebracht werden. Es ist geplant die besiedelten Zellträger dann auf das Infarktareal des Rattenherzens zu implantieren, um dort ischämisches Gewebe zu regenerieren bzw. ortsständige Zellen zur Regeneration anzuregen.

Mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur (UCMSC) werden wie unter 4.2 beschrieben, gewonnen und kultiviert. Im Folgenden ist beabsichtigt, sowohl undifferenzierte als auch kardiomyogen differenzierte UCMSC (siehe 4.3) zur Besiedelung von Zellträgern (siehe 4.4) zu verwenden. Die besiedelten Zellträger sollen schließlich zur Regeneration des ischämischen Gewebes nach experimentellem Myokardinfarkt in einem Rattenmodell eingesetzt werden. Dabei ist geplant, die besiedelten Zellträger auf das Infarktareal zu implantieren, wodurch UCMSC bzw. cUCMSC das ischämische Gewebe regenerieren bzw. ortsständige Zellen zur Regeneration anregen.

4.2 Kultivierung von UCMSC

Sämtliche Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank prozessiert und bei 37 °C / 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben, waren alle zur Zellkultur eingesetzten Medien/Lösungen auf 37 °C temperiert.

4.2.1 Zellisolierung

Für die Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) wurden ausschließlich Nabelschnüre verwendet, bei denen der Zeitraum zwischen Geburt und Weiterverarbeitung 48 h nicht überstieg. Die Nabelschnüre wurden dabei komplett und irreversibel anonymisiert von der Klinik Dr. Wolfart in Gräfelfing bereitgestellt. Eine entsprechende Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München lag vor.

Die Lagerung und der Transport der Nabelschnüre erfolgten in einer Transportlösung aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit Zusatz von 10 % fetalen bovinem Serum (FBS).

Die Primärzellkultur von UCMSC aus der intervaskulären Wharton'schen Sulze wurde durch enzymatischen Verdau des Nabelschnurgewebes nach einer Methode von Seshareddy et al. gewonnen [110]. In einer mit PBS (RT) gefüllten Petrischale wurde die Nabelschnur mit Hilfe eines Skalpell in ca. 2-3 cm große Stücke zerlegt, die anschließend – der Länge nach aufgeschnitten – von den beiden arteriellen Gefäßen befreit wurde (siehe Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2. Isolierung von UCMSC. Die native Nabelschnur (A) wurde mechanisch in die Wharton'sche Sulze (B) und Arterien (C) zerlegt. Die Gewinnung von UCMSC erfolgte anschließend durch enzymatischen Verdau der Wharton'schen Sulze und Kultivierung des resultierenden Zellpellets. Die Arterien wurden ohne Enzymverdau zum Auswachsen perivaskulärer MSC kultiviert [modifiziert von [51]].

Das Gewebe wurde in einer Enzymlösung aus 300 U/ml Kollagenase I und 1 mg/ml Hyaluronidase in PBS für 1 h im Brutschrank verdaut und verbleibende Fragmente anschließend mittels einer flachen Pinzette über einem Zellsieb komprimiert. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, das gesamte Zellpellet in 4 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer T25 Zellkulturflasche ausgesät. Im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz von UCMSC wurden diese zum Einen in *StemPro® MSC SFM* mit 2 % GMP-zertifiziertem Humanserum (hS) kultiviert. Zum Anderen erfolgte die Kultur von UCMSC in xeno- und serumfreiem *MesenCult®-XF* Medium. Die Kulturflaschen waren zusätzlich mit *MesenCult®-XF Attachment Substrate* beschichtet [51].

Die Kultivierung der intervaskulären UCMSC erfolgte unter zweitägigem Mediumwechsel bei 37 °C / 5 % CO₂. Zur Kultivierung von perivaskulären UCMSC wurden 5-10 arterielle Gefäße in eine T25 Zellkulturflasche mit 4 ml Kulturmedium überführt und bei zweitägigem Mediumwechsel im Brutschrank inkubiert. Nach siebentägiger Kultur wurden die Arterien verworfen und ausgesprossene perivaskuläre UCMSC unter zweitägigem Mediumwechsel weiter inkubiert.

4.2.2 Zellpassage

Die adhärent wachsenden UCMSC wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dadurch wurden bei der Trypsinierung ein Ablösen der UCMSC im Zellverband und damit eine Aggregation der UCMSC (Sphäroidbildung) nach Aussaat vermieden. Eine schonende enzymatische Dissoziation von UCMSC, die in *StemPro® MSC SFM* kultiviert wurden, gewährleistet die synthetische Trypsin-Ersatzlösung *TrypLE™*. Das Ablösen von UCMSC, die in *MesenCult®-XF* kultiviert wurden, erfolgt mit einer im Medium-Kit enthaltenen Trypsinanalogen-Lösung (*MesenCult®-ACF Dissociation Solution*).

Nachdem das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen wurde, wurde *TrypLE™* bzw. *MesenCult®-ACF Dissociation Solution* so hinzugegeben, dass der Boden des Kulturgefäßes bedeckt war (Zellkulturflaschen T25 = 1 ml, T75 = 3 ml).

Hat sich die Mehrheit der Zellen vom Gefäßboden abgelöst und schwimmen diese abgerundet in Lösung, wurde die Wirkung von *TrypLE™* durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium im Verhältnis 1:2 inaktiviert. Die Wirkung der *MesenCult®-ACF Dissociation Solution* wurde durch Zugabe der *MesenCult®-ACF Inhibition Solution* im Verhältnis 1:2 inaktiviert.

Nach Überführung der erhaltenen Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen wurde 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das erhaltene Pellet resuspendiert.

Für die Aussaat von $1,2 \times 10^4$ Zellen/cm² in ein neues Kulturgefäß, wurde die Zellzahl mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, wie unter 4.6.1 beschrieben, im Trypanblau-Ausschlussverfahren bestimmt.

Das Volumen an insgesamt benötigtem Expansionsmedium ist abhängig vom Kulturgefäß, dessen Boden bedeckt sein sollte (Zellkulturflaschen T25 = 4 ml, T75 = 12 ml). Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.2.3 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung von UCMSC wurden diese für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand an Kulturmedium dekantiert und das verbleibende Pellet in 1 ml Kryomedium je 10^6 UCMSC resuspendiert. Dabei bestand das Kryomedium aus 70 % Kulturmedium, 20 % Humanserum (hS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Zellsuspension wurde in 1 ml Kryoröhrchen überführt und unverzüglich bei einer Abkühlrate von 1 °C/min in einer entsprechenden Einfrierbox für 1-3 Tage bei -80 °C gelagert. Die Langzeitlagerung der Kryoröhrchen bis zum Zeitpunkt der weiteren Verwendung erfolgte in flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

Nach Lagerung der Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigen Stickstoff, wurden diese im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde umgehend im Verhältnis 1:10 in Kulturmedium verdünnt und anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung entsprechend ausgesät.

4.3 Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC

Für eine kardiomyogene Differenzierung von UCMSC (cUCMSC) wurden diese zunächst wie unter 4.2.2 beschrieben in MesenCult®-XF Medium in Kultur gehalten. Zwischen Passage p2 und p6 wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % nach unterschiedlichen Vorgehensweisen differenziert.

4.3.1 Differenzierung nach Goumans et al.

UCMSC wurden nach einmaligem Waschen mit PBS für 72 h in IMDM/Hams F-12-Medium (1:1), das neben L-Glutamin noch 2 % Pferdeserum, 1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 1 % Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), 10^{-4} M Ascorbinsäure und 5 µM 5-Azazytidin enthielt, bei 37 °C/5 % CO₂ kultiviert. Nach dieser Behandlung wurden die UCMSC in Erhaltungsmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glukose (DMEM hg) und 1 ng/ml Transforming-growth-factor-β1 (TGF-β1), unter dreitägigem Mediumwechsel für mindestens 30 Tage in Kultur gehalten [49].

4.3.2 Differenzierung nach Maltsev et al.

UCMSC wurden wie unter 4.2.2 beschrieben passagiert und das Zellpellet anschließend mit Differenzierungsmedium auf eine Zellzahl von 5×10^4 UCMSC/ml verdünnt. Dabei bestand das Differenzierungsmedium aus DMEM mit 4.5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin, 5×10^{-5} M β -Mercaptoethanol, 1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) und 20 % FBS.

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, wurde im Folgenden die Zellsuspension in Tropfen mit einem Volumen von je 20 μ l in den Deckel einer Zellkulturschale pipettiert. Dieser wurde dann vorsichtig auf den mit 10 ml PBS befüllten Boden der Schale aufgesetzt. Die so entstehenden „hängenden Tropfen“ wurden für 2 Tage unter Brutschrankbedingungen inkubiert, wobei ein Austrocknen der Tropfen durch das im Schalenboden befindliche PBS vermieden wurde.

Unter Einwirkung der Schwerkraft bilden sich während der zweitägigen Inkubationszeit in den „hängenden Tropfen“ kugelförmige Zellagglomerate, welche in der Literatur bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen als sogenannte „embryoid bodies“ beschrieben sind. Diese wurden im Weiteren in eine Bakterienkulturschale überführt, indem die Zellagglomerate bei schräg gehaltenem Schalendeckel mit 3 ml Differenzierungsmedium abgespült und vereinigt wurden.

Die nun in Suspension vorliegenden Zellagglomerate wurden für weitere fünf Tage in Kultur gehalten. Am siebten Tag nach Aussaat wurden die Zellagglomerate in einem 40 μ m Zellsieb gesammelt und bis zu 15 Stück pro Schale zur Adhäsion in eine 0,1 % gelatinebeschichtete 4 cm Zellkulturschale mit 3 ml Differenzierungsmedium umgesetzt und unter zweitägigem Mediumwechsel für vier Wochen kultiviert [77].

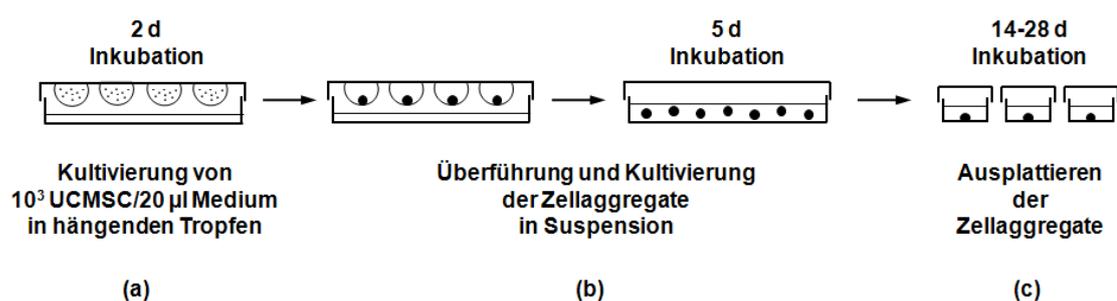


Abbildung 4.3. Schematische Darstellung der kardiomyogenen Differenzierung von UCMSC durch Generierung sogenannter „embryoid bodies“ [modifiziert von [77]]. Zur Bildung dieser Zellaggregate wurden 10^3 UCMSC/20 μ l Medium in hängenden Tropfen für 2 d inkubiert (a). Resultierende Zellaggregate wurden für weitere 5 d als Suspensionskultur gehalten (b), anschließend ausplattiert und für 14-28 d kultiviert (c).

4.3.3 Differenzierung nach Matsuura et al.

UCMSC wurden mit einer Zellzahl von $1,2 \times 10^4$ UCMSC/cm² in Differenzierungsmedium, bestehend aus Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation unter Brutschrankbedingungen wurden die UCMSC gemäß Matsuura Protokoll I für 72 h mit 10 µM 5-Azazytidin bzw. gemäß Matsuura Protokoll II mit 10 nM Oxytocin behandelt. Im Folgenden wurde das Differenzierungsmedium für einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen, jeden dritten Tag gewechselt [83].

4.3.4 Differenzierung nach Wang et al.

UCMSC wurden nach einmaligem Waschen mit PBS für 24 h in serumfreiem DMEM mit 4,5 g/l Glukose unter Zusatz von 3 µM 5-Azazytidin bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die UCMSC in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 10 % FBS (Erhaltungsmedium), bei zweitägigem Mediumwechsel, vier bis fünf Wochen in Kultur gehalten [136].

4.3.5 Differenzierung nach Wu et al.

UCMSC wurden nach einmaligem Waschen mit PBS für 24 h in DMEM F-12 unter Zusatz von 5 µM 5-Azazytidin bei 37°C / 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die UCMSC in Erhaltungsmedium bestehend aus DMEM F-12, 5 % FBS, 10 ng/ml basic fibroblast-growth-factor (bFGF), 10 ng/ml platelet-derived-growth-factor (PDGF) unter zweitägigem Mediumwechsel für mindestens 30 Tage in Kultur gehalten [146].

4.4 *In vitro* Besiedelung von Zellträgern mit UCMSC

4.4.1 Zellen

Zur Besiedelung von Zellträgern wurden UCMSC in Passage p4 bis p6 verwendet. Die Kultivierung der UCMSC erfolgte in StemPro® MSC SFM supplementiert mit 2 % GMP-konformen Humanserum (hS) gemäß 4.2.2 bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % (siehe Abbildung 4.4 A), um die Entstehung von Sphäroiden (siehe Abbildung 4.4 B) zu vermeiden. Durch die Bildung derartiger dreidimensionaler Zellanhäufungen ist nach Subkultivierung die Besiedelung von Zellträgern mit Einzelzellen nicht möglich.

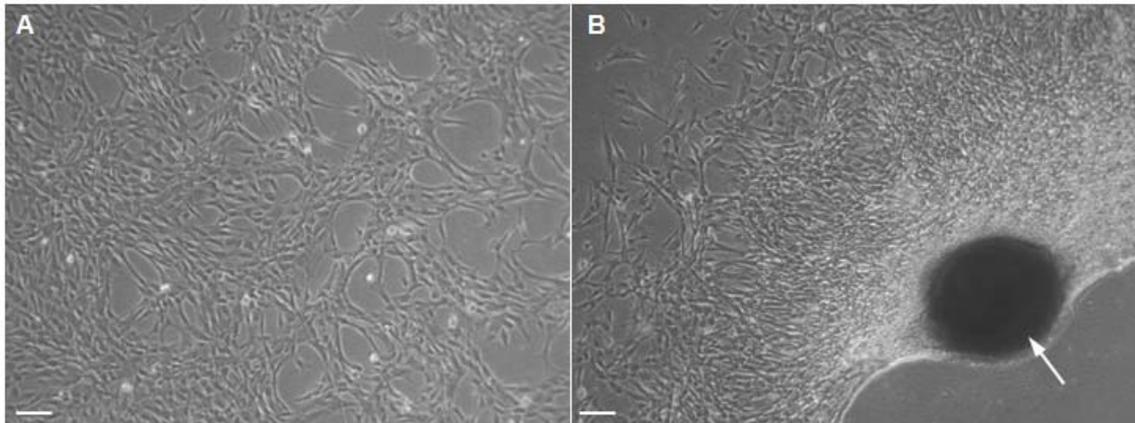


Abbildung 4.4. Spähroidbildung von UCMSC. UCMSC bei einer Konfluenz von 80 % lassen sich vereinzeln (A). Durch Überschreiten der Konfluenz bilden UCMSC unerwünschte Zellaggregate, die eine Besiedelung von Zellträgern mit Einzelzellen unmöglich machen (B). Maßstabsbalken = 100 µm, Vergrößerung 100 x.

4.4.2 Zellträger

Als Zellträger wurden das GORE-Tex® Dualmesh® Biomaterial (DM) und GORE-Tex® Cardiovascular Patch (CVP) sowohl unbeschichtet als auch titanisiert (siehe 4.4.3) verwendet. Beide Zellträger sind bereits klinisch geprüft und bestehen aus multiaxial expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) mit hervorragender Biokompatibilität. Das biologisch nicht-degradierbare ePTFE ist ein kristallines, thermoplastisches Polymer mit einem Schmelzpunkt von 327 °C und einer Glasübergangstemperatur von 127 °C. Das DM mit einer Stärke von 1 mm und einer Zugfestigkeit von 1,2 MPa sowie das CVP mit einer Stärke von 0,4 mm und einer Zugfestigkeit von 29,8 MPa wurden freundlicherweise von W. L. Gore Associates GmbH (Putzbrunn, Deutschland) zur Verfügung gestellt. DM verfügt über zwei Seiten mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen. Die eine Seite reduziert das Anwachsen von Gewebe durch eine dichte Oberfläche mit Porengrößen unter 1 µm. Das Einwachsen von Gewebe auf der anderen Seite wird durch eine gerippte, makroporöse Oberfläche mit Porengrößen von 36 µm ermöglicht. CVP weist dagegen eine homogene, makroporöse Oberfläche mit Porengrößen von 22 µm auf.

4.4.3 Titanisierung von Zellträgern

Die Titanbeschichtung der unter 4.4.2 genannten Proben erfolgte durch plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PACVD) bei Temperaturen < 40 °C (pfm medical titanium gmbh, Nürnberg, Deutschland). Dabei wurde die organometallische Verbindung Tetracisdimethylamidotitan (TMT, $\text{Ti}[\text{N}(\text{CH}_3)_2]_4$). (Präkursor) verdampft und mit Hilfe eines Trägergasstromes in eine Beschichtungskammer transportiert. Dort kommt es infolge der Plasmaeinwirkung im Vakuum zur Aufspaltung der Präkursormoleküle in fraktionierte, radikalisierte Molekülbestandteile. Diese

Bruchstücke reagieren auf der dem Plasma ausgesetzten Oberfläche zu stabilen Verbindungen und bilden eine kovalent gebundene Beschichtung mit einer Stärke von 30 nm [142,143]. Der Ablauf einer PACVD ist nachfolgend in Abbildung 4.5 schematisch dargestellt.

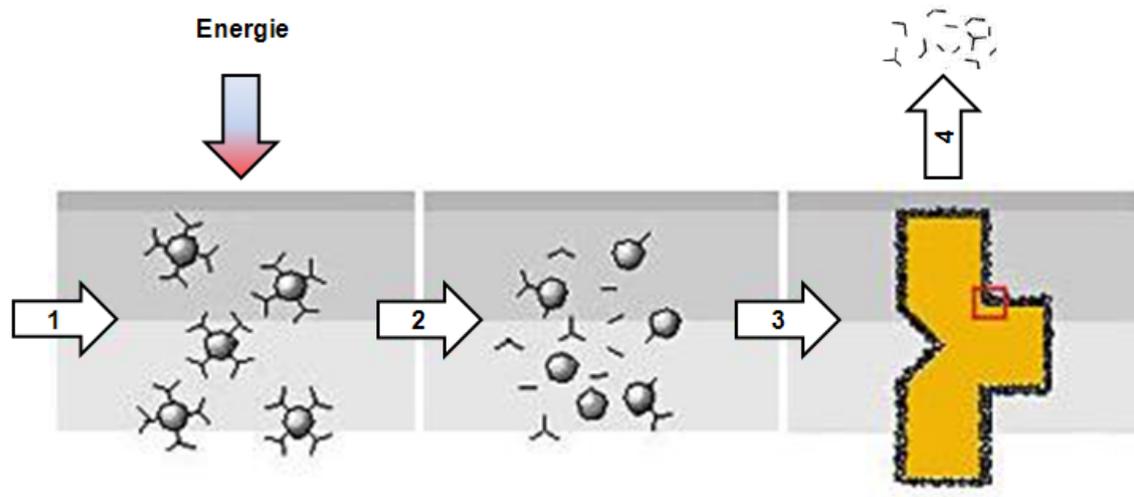


Abbildung 4.5. Schematische Darstellung des PACVD-Prozesses [modifiziert von [143]]. Nach Antransport des Präkursors (1) wird dieser durch Energiezufuhr zerlegt (2) und auf der Substratoberfläche abgeschieden (3), wobei nicht schichtbildende Restbestandteile abtransportiert werden (4).

4.4.4 Sterilisation von Zellträgern

Die Sterilisation von unbeschichteten und titanisierten Zellträgern aus ePTFE erfolgt in Wasserdampf bei 121 °C und 2 bar für 20 min.

4.4.5 Besiedelungstechnik zur statischen Analyse

Für die Besiedelung und anschließende Analytik von potentiellen Zellträgern (siehe 3.5) im 96-Well-Format, wurden diese mittels eines entsprechenden Locheisens mit einem Durchmesser von 6 mm ausgestanzt (siehe Abbildung 4.6).



Abbildung 4.6. Locheisen und rund ausgestanzter Zellträger. Zellträger wurden mittels eines Locheisens von 6 mm Durchmesser, zur Besiedelung und Analytik im 96-Well-Format ausgestanzt.

Nach Sterilisation (siehe 4.4.4) wurden die Zellträger mit einer sterilen Pinzette in 96-Well Zellkulturplatten positioniert. Um während der Besiedlung ein Aufschwimmen der runden Zellträger im Kulturmedium zu vermeiden und somit eine reproduzierbare, zentrierte Besiedelung der unterschiedlichen Materialien zu ermöglichen, wurden spezielle Einsätze auf die Zellträger (siehe Abbildung 4.7 A) platziert. Diese aus Teflon® bestehenden Zylinder wurden mit einem Außendurchmesser von 6 mm, einem Innendurchmesser von 3 mm und einer Höhe von 8 mm (siehe Abbildung 4.7 B) von der Werkstatt des Klinikums der Universität München angefertigt.

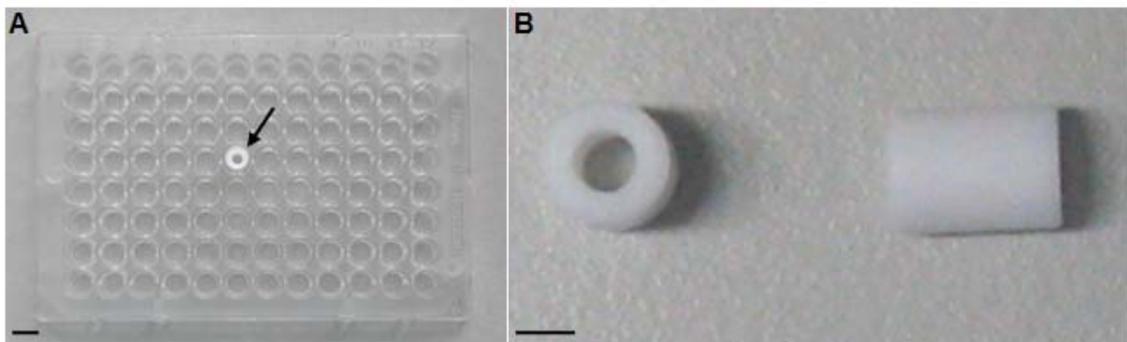


Abbildung 4.7. Teflon® Einsätze zur reproduzierbaren Besiedelung von Zellträgern in 96-Well Zellkulturplatten (A). Teflon® Einsätze mit einer Höhe von 8 mm, 6 mm Außen- und 3 mm Innendurchmesser (B). Maßstabsbalken = 3 mm.

Pro Teflon® Zylinder wurden 5×10^3 UCMSC ($\approx 7 \times 10^2$ UCMSC/mm²) in 50 μ l Kulturmedium für eine subkonfluente Besiedelung ausgesät und unter Brutschrankbedingungen zur Bestimmung der Anwachsrate (siehe 4.6.4), Vitalität (siehe 4.6.5), Proliferation (siehe 4.6.6) und Morphologie (siehe 4.6.7) inkubiert.

4.4.6 Besiedelungstechnik für dynamische Beanspruchung

Für die Besiedelung und anschließende mechanische Belastung von Zellträgern in einem eigens dafür konstruierten Bioreaktor (siehe 4.5), wurden die Zellträger mittels eines Locheisens mit den Maßen 7,5 mm x 7,5 mm ausgestanzt (siehe Abbildung 4.8 A). Zur Befestigung im Bioreaktor wurden die Zellträger mit chirurgischem Nahtmaterial versehen (siehe Abbildung 4.8 B).



Abbildung 4.8. Locheisen und quadratisch ausgestanzter Zellträger. Zellträger wurden mittels eines Locheisens von 7,5 mm x 7,5 mm, zur Besiedlung im 24-Well-Format und anschließender mechanischer Belastung in einem Bioreaktor, ausgestanzt (A). Zur Befestigung im Bioreaktor wurden die Zellträger mit chirurgischem Nahtmaterial versehen (B). Maßstabsbalken: A = 1 cm, B = 1 mm.

Nach Sterilisation (siehe 4.4.4) wurden die Zellträger mit einer sterilen Pinzette in 24-Well Zellkulturplatten positioniert. Um während der Besiedlung ein Aufschwimmen der quadratischen Zellträger im Kulturmedium zu vermeiden und somit eine reproduzierbare, zentrierte Besiedlung zu ermöglichen, wurden kommerziell erhältliche Edelstahl-Silikon-Einsätze auf die Zellträger platziert (siehe Abbildung 4.9 A). Diese zylindrischen, sogenannten „Fences“ sind mit einem Außendurchmesser von 16 mm und einem Innendurchmesser von 6,7 mm erhältlich (siehe Abbildung 4.9 B).



Abbildung 4.9. Edelstahl-Silikon-Einsätze („Fences“) zur reproduzierbaren Besiedlung von 7,5 mm x 7,5 mm Zellträgern in 24-Well Zellkulturplatten (A). Schematische Darstellung eines aus Edelstahl (1) gefertigten Fence mit 16 mm Außen- bzw. 6,7 mm Innendurchmesser und Silikonabdichtung (2) sowie einer Füllrinne (3) [modifiziert von aix-scientifics.de] (B). Die Befüllung des Wells mit Medium über die Füllrinne verhindert ein Flüssigkeitsgefälle zwischen dem Fence und dem umgebenden Well.

Um ein Flüssigkeitsgefälle zwischen dem *Fence* und dem umgebenden Well zu vermeiden, wurde über die Füllrinne am *Fence* das umgebende Well mit 650 μ l Kulturmedium befüllt. Je *Fence* wurden dann $2,5 \times 10^4$, $1,5 \times 10^4$ bzw. $1,0 \times 10^4$ UCMSC ($\approx 7 \times 10^2$, 4×10^2 bzw. 3×10^2 UCMSC/mm²) in 150 μ l Kulturmedium für eine konfluente Besiedlung ausgesät. Die Inkubation unter statischen Bedingungen erfolgte bis zur dynamischen Belastung in einem eigens dafür konstruierten Bioreaktor (siehe 4.5) für 1-5 d bei 37 °C / 5 % CO₂. Anschließend wurden die Zellträger hinsichtlich der Anwachsrate (siehe 4.6.4) und Morphologie (siehe 4.6.7) analysiert.

4.5 Entwicklung eines pulsatilen Bioreaktors

4.5.1 Konzeption

Für die Überprüfung der mechanischen Belastbarkeit von besiedelten Trägermaterialien unter physiologischen Bedingungen des pulsierenden Herzens wurde ein entsprechender Bioreaktor entwickelt (siehe 6.1). Dabei war die Forderung nach einer einfachen und günstigen Fertigung, sowie sterilisierbaren Materialien zu berücksichtigen. Zudem war die Nährstoff-, Temperatur- und CO₂-Versorgung von mehreren besiedelten Zellträgern zu gewährleisten.

4.5.2 Konstruktion

Die Erstellung dreidimensionaler Modelle und abgeleiteter zweidimensionaler Zeichnungen sämtlicher Generationen von Bioreaktoren erfolgte mittels der CAD-Software CATIA V5R19. Die einzelnen Komponenten des Bioreaktors wurden von der Werkstatt des Klinikums der Universität München angefertigt.

4.5.3 Sterilisation

Die Sterilisation des Bioreaktors beschränkte sich auf die Komponenten, die mit Zellen und/oder Zellkulturmedium in Kontakt kamen. Dies waren im Einzelnen die Medienkompartimente, Clipsysteme, Pulsmembranen, Dichtungsringe, Beilagscheiben und das Probenkompartiment. Die Gassterilisation erfolgte durch Formaldehyd-bedampfung bei Temperaturen zwischen 60 °C und 75 °C für 7 h in der Sterilisationsabteilung des Klinikums der Universität München.

4.5.4 Sterilitätsprüfung

Zur Überprüfung der Sterilität wurde der Bioreaktor unter physiologischen Bedingungen in einem Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂) betrieben und nach 24 h sowie nach 96 h eine Medienprobe aus den Medienkompartimenten entnommen. Die mikrobiologische Untersuchung der Proben erfolgte durch das Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München.

4.5.5 Funktionsprüfung

Die Funktionalität des Bioreaktors wurde makroskopisch durch die Kontrolle einer pulsierenden Meniskusbewegung in den Medienkompartimenten überprüft. Zudem erfolgte eine sensorische Druckmessung im Druckkompartiment zur Ermittlung der Druckamplitude.

4.6 Analytik

4.6.1 Zellzählung

Die Lebendzellzahl wurde in einem aufrechten Lichtmikroskop mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein definiertes Aliquot der zu messenden Zellsuspension im Verhältnis 1:2 in Trypanblau suspendiert und die Zahl vitaler (ungefärbter) Zellen nach folgender Formel ermittelt:

$$Z = (Z_4/4) \times 5000 \times F_V \times V$$

Z = Lebendzellzahl

Z₄ = Summe der vitalen Zellen von 4 Großquadranten

F_V = Verdünnungsfaktor

V = Volumen der Zellsuspension

4.6.2 Durchflusszytometrie

Zur Phänotypisierung der UCMSC wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit mesenchymaler (CD73, CD90, CD105) und die Abwesenheit hämatopoetischer Oberflächenmarker (CD34, CD45) sowie MHC Klasse II Molekülen (HLA-DR) in Passage 1 analysiert, wobei murine Isotyp-Antikörper als Kontrolle mitgeführt wurden [55].

Zunächst wurde die Zellzahl, wie unter 4.6.1 beschrieben, bestimmt und 10⁶ Zellen/ml in PBS/10 % FBS durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm (4 °C) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in je 1 ml PBS/10% FBS für 5 min bei 1200 rpm (4 °C) gewaschen.

Die Inkubation der direkt-markierten Antikörper und deren zugehörige Isotypen erfolgten gemäß Herstellerprotokoll in einer Verdünnung von 1:5 in je 100 µl PBS/10% FBS bei 4 °C für 45 min.

Nach Inkubation der Antikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS/10% FBS gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension in je 1 ml PBS/10% FBS verdünnt, für 5 min bei 1200 rpm (4 °C) zentrifugiert und das Zellpellet in 300 µl PBS/10% FBS resuspendiert. Zur Abgrenzung der vitalen von der letalen Zellpopulation wurde der Zellsuspension jeweils 0,2 µg/ml Propidiumjodid zugegeben und diese umgehend durchflusszytometrisch vermessen.

4.6.3 Funktionelle Charakterisierung

Funktionell wurden die UCMSC durch ihre Fähigkeit, in Osteozyten und Adipozyten zu differenzieren, charakterisiert [23,29].

Osteogene Differenzierung

UCMSC wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1 g/l Glukose (DMEM lg), 10 % FBS, 0,1 μ M Dexamethason, 0,2 μ M Ascorbinsäure und 10 mM β -Glycerolphosphat für 14-21 Tagen unter 3-4 tägigen Mediumwechsel kultiviert.

Die osteogene Differenzierung von UCMSC wurde durch die Anfärbung von Kalziumeinlagerungen mittels Alizarin-Rot-Färbungen nachgewiesen. Dazu wurde zunächst die Färbelösung aus 10 mg/ml Alizarin Red S (= Alizarin sulfosaures Natrium) in H₂O und 25 %igen Ammoniak in einer Verdünnung von 1:100 hergestellt. Nach einmaligem Waschen der adhärennten UCMSC mit PBS, wurden die Zellen für 10 min bei RT in 100 % Methanol fixiert und anschließend in dest. H₂O gewaschen. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte zwischen 10 und 120 min bei RT bis eine deutliche, clusterförmige Orangefärbung zu beobachten war. Nach dreimaligen Waschen mit dest. H₂O wurden die osteogen differenzierten UCMSC schließlich im Hellfeld mikroskopiert.

Adipogene Differenzierung

UCMSC wurden in DMEM lg, 1 μ g/ml Ascorbat-1-Phosphat, 10⁻⁷ M Dexamethason und 50 μ g/ml Indomethacin für 14-21 Tage unter 3-4 tägigen Mediumwechsel kultiviert.

Die adipogene Differenzierung von UCMSC wurde durch die Anfärbung von Lipiden mittels Oil Red O Färbungen überprüft. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung aus 5 mg/ml Oil Red O (= Solvent Red 27, Sudan Red 5B, C.I. 26125) in 99 % Isopropanol hergestellt. Eine 60 %ige Gebrauchslösung wurde 24 h vor Gebrauch angesetzt um zu äquilibrieren und wurde direkt vor Verwendung sterilfiltriert. Nach einmaligem Waschen der adhärennten UCMSC mit PBS, wurden die Zellen für 10 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in dest. H₂O gewaschen. Nach einer Vorinkubation von 5 min in 60 % Isopropanol erfolgte die Inkubation in der Gebrauchslösung für 2-24 h bei RT bis eine deutliche rot-braune Färbung der Lipidtröpfchen zu beobachten war. Nach einmaligen Waschen mit 60 % Isopropanol und dreimaligem Waschen mit dest. H₂O wurden die adipogen differenzierten UCMSC schließlich im Hellfeld mikroskopiert.

4.6.4 Zellmarkierung

Zur Visualisierung der UCMSC auf dem Zellträger wurden die Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid; Absorption 359 nm) gefärbt, der bei 461 nm blaues Fluoreszenzlicht emittiert (siehe Abbildung 4.10).

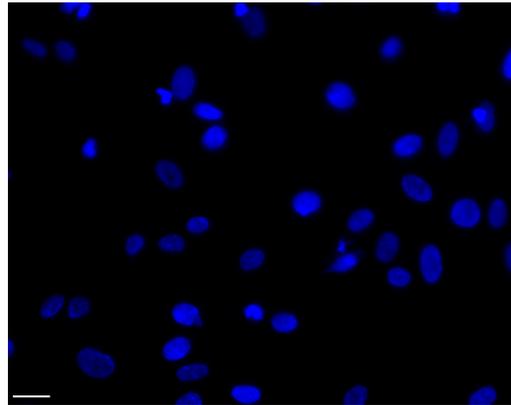


Abbildung 4.10. Kernfärbung von UCMSC mittels 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI) zur Bestimmung der Anwachsrate auf Zellträgern. Durch das DNA-interkalierende DAPI emittieren die Zellkerne von UCMSC nach Fluoreszenzabsorption blaues Licht. Maßstabsbalken = 25 μm , Vergrößerung 400 x.

Die Zellträger wurden 24 h nach statischer Besiedelung bzw. nach mechanischer Belastung (siehe 4.4) mit PBS gewaschen und für 5 min mit Methanol/Aceton (1:2) fixiert. In einem Volumen von 200 μl wurden die Zellen dann mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI für 20 min bei RT inkubiert und anschließend bei direkter UV-Anregung im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Zur Quantifizierung adhärenter UCMSC nach statischer Besiedelung wurde der prozentuale Anteil adhärenter UCMSC bestimmt und auf den Prozentsatz von UCMSC, die in Standard-Zellkulturplatten aus Polystyren adhärten, normiert. Zur Quantifizierung adhärenter UCMSC nach mechanischer Belastung wurde der prozentuale Anteil adhärenter UCMSC bestimmt und auf den Prozentsatz von UCMSC ohne mechanische Belastung normiert.

4.6.5 Vitalfärbung

Der LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay wurde zur Untersuchung der Vitalität von UCMSC nach Aussaat auf Zellträgern unterschiedlicher Textur herangezogen. Die beiden Reagenzien Calcein AM (Calceinacetoxymethylester; Absorption 493 nm) und Ethidiumhomodimer (Phenanthridinium, 5,5'-(1,2-ethandiylbis (imino-3,1-propandiyl)bis(3,8-diamino-6-phenyl, dichlorid, hydrochlorid, EthD; Absorption 528 nm) geben bei gleichzeitiger Zugabe zu suspendierten oder adhärenen Zellen, Aufschluss über vitale bzw. letale Zellen. Nach 24 stündiger Inkubation von potentiell besiedelten Zellträgern (siehe 4.4) wurden 100 $\mu\text{l/well}$ einer Gebrauchslösung von 2 μM Calcein AM und 4 μM EthD-1 zugesetzt, mehrfach suspendiert und 20 min im Brutschrank inkubiert. Die Fluoreszenz der vitalen (Calcein AM) sowie der letalen (EthD) Zellen wurde anschließend mikrofotografisch dokumentiert (siehe Abbildung 4.11). Zunächst wurde der prozentuale Anteil letaler Zellen bestimmt und daraus der Prozentsatz vitaler Zellen hochgerechnet. Dieser Prozentsatz wurde dann auf den Prozentsatz vitaler UCMSC in Standard-Zellkulturplatten aus Polystyren normiert.

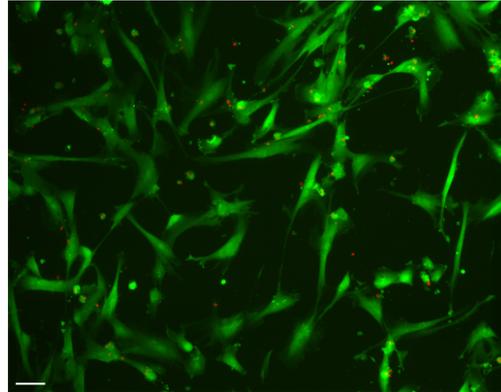


Abbildung 4.11. LIVE/DEAD®-Färbung von UCMSC zur Vitalitäts-/Letalitäts-Bestimmung besiedelter Zellträger. Vitale UCMSC emittieren nach Fluoreszenzabsorption durch das enzymatisch umgesetzte Calcein AM, grünes Licht. Letale UCMSC emittieren nach Fluoreszenzabsorption durch das DNA-interkalierende Ethidiumhomodimer rotes Licht. Maßstabsbalken = 100 μm , Vergrößerung 200 x.

4.6.6 Bestimmung der Proliferationskapazität

Hierbei handelt es sich um eine photometrische Bestimmung der zellulären Proliferation, die auf der zeitabhängigen Umsetzung des hellroten Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-(3-84-jodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzen Disulfonat) in tiefgelbes Formazan (siehe Abbildung 4.12) durch mitochondriale Dehydrogenasen beruht. Unter der Annahme, dass die mitochondriale Aktivität der Zelle konstant bleibt, kann bei einer Erhöhung dieser Aktivität von einer vermehrten Proliferation der Zellen ausgegangen werden.

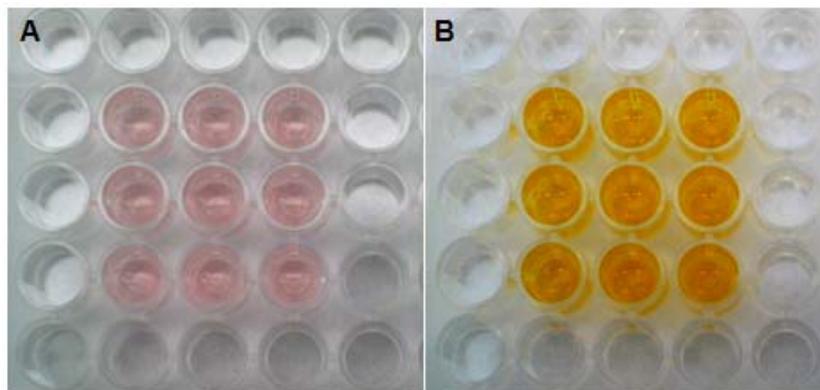


Abbildung 4.12. WST-1 assay zur Bestimmung der Proliferation von UCMSC auf Zellträgern. WST-1 Reagenz vor Umsetzung durch UCMSC (A) und WST-1 Reagenz nach Umsetzung durch UCMSC (B). Die zeitabhängige Änderung der optischen Dichte wird als Maß der Proliferation von UCMSC herangezogen.

Der WST-1-Proliferations-Assay wurde gewählt, weil er auf radioaktive und kanzerogene Substanzen verzichtet.

Für die Durchführung des Tests wurden die Zellträger wie unter 4.4.5 beschrieben mit 7×10^2 UCMSC/mm² besiedelt und für ein bis drei Tage inkubiert. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde das WST-1 Reagenz im Verhältnis 1:10 zugegeben und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader. Die OD von UCMSC auf Zellträgern wurden anschließend auf die OD von UCMSC, die in Standard-Zellkulturplatten aus Polystyren ausgesät wurden, normiert.

4.6.7 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) arbeitet anstelle von Licht mit Elektronen zur Bilderzeugung. Im REM werden durch Glühemission aus der Kathode Elektronen ausgelöst und durch ein elektromagnetisches Feld, beschleunigt. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf eine aufgedampfte, leitfähige Probenoberfläche werden Sekundärelektronen frei, die über ein Photomultipliersystem detektiert werden. Nach Verarbeitung des optischen zu einem elektrischen Signal und entsprechender Verstärkung erzeugt eine Software die Oberflächenstruktur.

Um eine mögliche Besiedelung unterschiedlicher Materialien im REM nachzuweisen, wurden diese über Nacht bei 4 °C in 3 % Glutardialdehyd fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert:

3 x 5 min bei RT in 30 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 56 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 70 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 96 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 100 % Aceton

1 x 5 min bei -20 °C in 100 % Aceton

Nach Fixierung und Dehydratation der Zellträger erfolgte die sogenannte Kritisch-Punkt-Trocknung. Dabei wird der Austausch von Aceton durch flüssiges CO₂ in sechs bis acht Schritten in einer Druckkammer bei 5 bis 10 °C und einem Druck von 40 bar mit anschließender Erwärmung über den kritischen Punkt von CO₂ gewährleistet. Voraussetzung der REM-Analyse biologischer Proben ist das Beschichten des zu analysierenden Materials beispielsweise mit Gold. Dafür wurde mittels eines Kathodenzerstäubers eine 10 bis 30 nm starke Goldschicht auf die Oberfläche des Biomaterials aufgebracht. Im Anschluss daran konnte die Probe rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden.

4.6.8 Immunzytochemie

Für den Nachweis einer kardiomyogenen Differenzierung von UCMSC (cUCMSC), wurden diese immunzytochemisch auf intrazelluläre kardiale Proteine untersucht. Undifferenzierte UCMSC dienten dabei als Negativkontrolle. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper erfolgte das nachfolgend beschriebene Vorgehen zusätzliche ohne Primärantikörper.

UCMSC/cUCMSC wurden in MesenCult®-XF Attachment Substrat beschichteten μ -Slides 18 Well ibiTreat bei einer Zelldichte von 5×10^3 /Well für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen der adhärennten UCMSC/cUCMSC mit PBS, wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und anschließend in PBS/0,1 % Triton® X-100 für 15 min permeabilisiert. Die Inkubation der in PBS/0,1 % Triton® X-100/1 % BSA verdünnten Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C in nachfolgenden Konzentrationen durchgeführt.

Antikörper	Konzentration
Mouse monoclonal anti-Actin, cardiac	10,0 μ g/ml
Mouse monoclonal anti-Actinin	2,0 μ g/ml
Mouse monoclonal to alpha Actin (sarcomeric)	1:25 Verdünnung gemäß Hersteller
Mouse monoclonal to alpha Actinin (sarcomeric)	1,0 μ g/ml
Mouse monoclonal to cardiac Troponin C	2,5 μ g/ml
Mouse monoclonal to cardiac Troponin I	2,5 μ g/ml
Mouse monoclonal anti-Connexin 43	10,0 μ g/ml
Mouse monoclonal to GATA4	2,0 μ g/ml
Mouse monoclonal to Myosin Heavy Chain	1,0 μ g/ml
Mouse monoclonal to Myosin (slow)	1,0 μ g/ml
Rabbit polyclonal to cardiac Troponin T	2,5 μ g/ml

Nach Waschen der UCMSC/cUCMSC in PBS/0,1 % Triton® X-100, wurden diese mit Alexa Fluor® 488 konjugierten goat anti mouse IgG Sekundärantikörpern in einer Konzentration von 5 μ g/ml bzw. mit FITC konjugierten goat anti rabbit IgG Sekundärantikörpern in einer Konzentration von 22 μ g/ml in PBS/0,1 % Triton® X-100 für 2 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Kerngegenfärbung mit DAPI in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 20 min bei RT. Nach einmaligem Waschen der UCMSC/cUCMSC mit PBS wurden die Zellen in Eindeck-Medium bei einer Anregungswellenlänge von 489 nm für Alexa Fluor® 488- (Emission 519 nm) bzw. FITC-konjugierte IgG (Emission 517 nm) und einer Anregungswellenlänge von 358 nm für DAPI mikroskopiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte durch ein computergestütztes Fluoreszenzmikroskop, wobei die Probe und die zugehörige Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers bei identischer Belichtungszeit gemessen wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Phänotypische Charakterisierung von UCMSC

UCMSC wurden wie unter 4.2 beschrieben isoliert und in Kultur gehalten.

5.1.1 Morphologie undifferenzierter UCMSC

In der Primärkultur war zunächst eine Vielzahl nicht-adhärenter kugelförmiger Zellen sichtbar (Abbildung 5.1 A). Sechs Tage nach Isolierung wurden erste adhärenente UCMSC beobachtet. Wie aus Abbildung 5.1 B ersichtlich, weisen die vereinzelt auftretenden UCMSC häufig einen breiten flossenartigen und einen spitz zulaufenden Pol auf. Mit steigender Kulturdauer und damit steigender Zelldichte, zeigen UCMSC ihre typische spindelförmige Morphologie mit einer Elongation des Zytoplasmas (Abbildung 5.1 C).

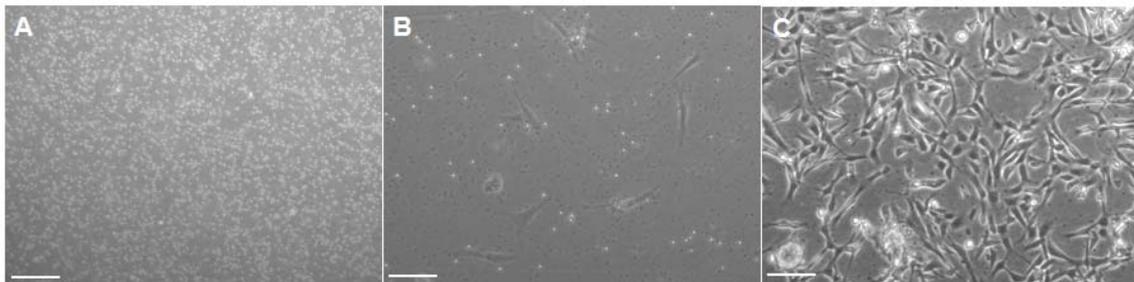


Abbildung 5.1. Morphologie undifferenzierter UCMSC. Tag 1 nach Isolierung: Kugelförmige Morphologie (A), Tag 6 nach Isolierung: Fibroblastoide Morphologie (B) Tag 13: Typische spindelförmige Morphologie. Maßstabsbalken = 200 μ m, Vergrößerung 200 x.

5.1.2 Expressionsprofil von Oberflächenantigenen

Durchflusszytometrische Untersuchungen (siehe 4.6.2) zeigten, dass xeno- und serumfrei kultivierte UCMSC nahezu 100 % positiv für die mesenchymalen Marker CD73, CD90 sowie CD105 sind (siehe Abbildung 5.2). Zudem sind UCMSC negativ für die hämatopoetischen Marker CD34 und CD 45 sowie den immunaktivierenden Marker HLA-DR (MHC Klasse II) [51].

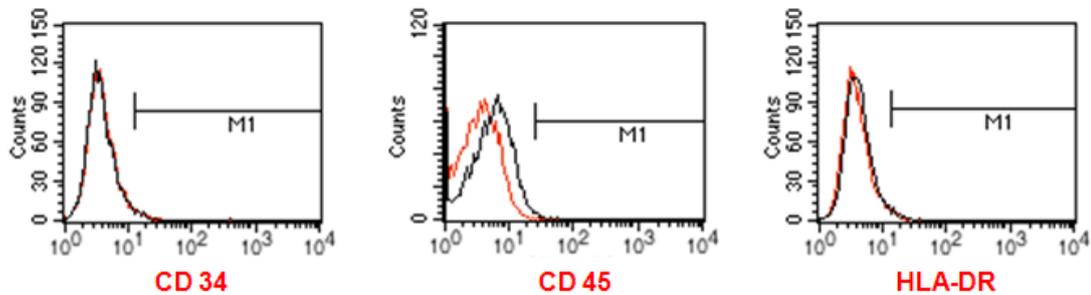
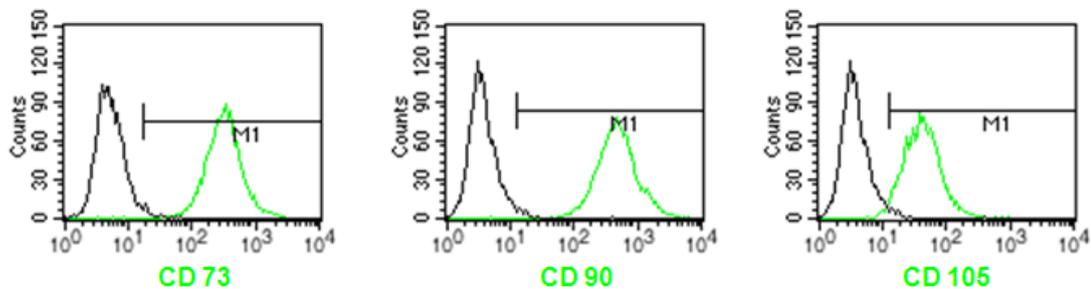
NEGATIV**POSITIV**

Abbildung 5.2. Oberflächen-Expressionsprofil von xeno- und serumfrei kultivierten UCMSC. UCMSC sind positiv für die mesenchymalen Marker CD73, CD90, CD105 und negativ für die hämatopoetischen Marker CD34, CD45 sowie für HLA-DR [modifiziert von [51]].

5.1.3 Funktionelle Charakterisierung

UCMSC wurden zur funktionellen Charakterisierung wie unter 4.6.3 beschrieben zu Osteozyten und Adipozyten differenziert.

Osteogene Differenzierung

Nach 14-21tägiger osteogener Differenzierung und Alizarin-Rot-Färbung potentieller Kalziumeinlagerungen zeigten die UCMSC eine intensive Orangefärbung von Mineralisierungszentren, wodurch eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix und damit eine osteogene Differenzierbarkeit der UCMSC vorliegen (siehe Abbildung 5.3).

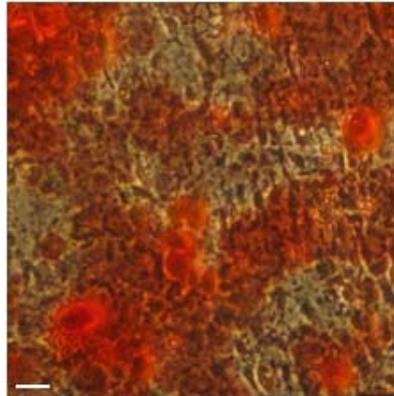


Abbildung 5.3. Hellfeldaufnahmen von osteogen differenzierten UCMSC [modifiziert von [51]]. Orange-farbene Bereiche zeigen kalzifizierte Strukturen. Maßstabsbalken = 100 μm ; Vergrößerung 100 x.

Adipogene Differenzierung

Nach 14-21tägiger adipogener Differenzierung und Oil-Red-O-Färbung potentieller Lipide zeigten die UCMSC eine rot-braune perinukleäre Färbung, wodurch eine Anreicherung von Lipiden in intrazellulären Speichervakuolen und somit eine adipogene Differenzierung der UCMSC vorliegt (siehe Abbildung 5.4).

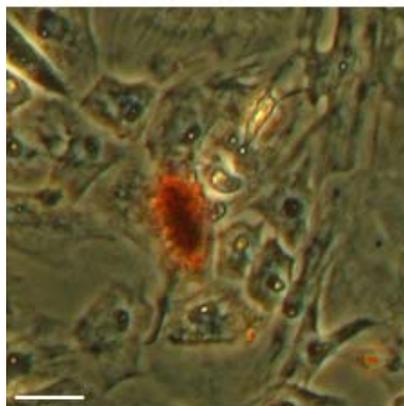


Abbildung 5.4. Hellfeldaufnahmen von adipogen differenzierten UCMSC [modifiziert von [51]]. Rot-braune perinukleäre Bereiche zeigen die Anreicherung von Lipiden. Maßstabsbalken = 200 μm ; Vergrößerung 400 x.

5.2 Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC

5.2.1 Morphologie kardiomyogen differenzierter UCMSC

Die kardiomyogene Differenzierung von UCMSC wurde wie unter 4.3 beschrieben durchgeführt.

Im Gegensatz zur fibroblastoiden Morphologie undifferenzierter UCMSC (Abbildung 5.5 A), zeigen kardiomyogen differenzierte UCMSC (cUCMSC) ein flächiges Erscheinungsbild mit kurzen zytoplasmatischen Ausläufern. Des Weiteren weisen cUCMSC ein ausgeprägtes striates Muster auf, welches auf die Formation von Fibrillen hindeutet (Abbildung 5.5 B).

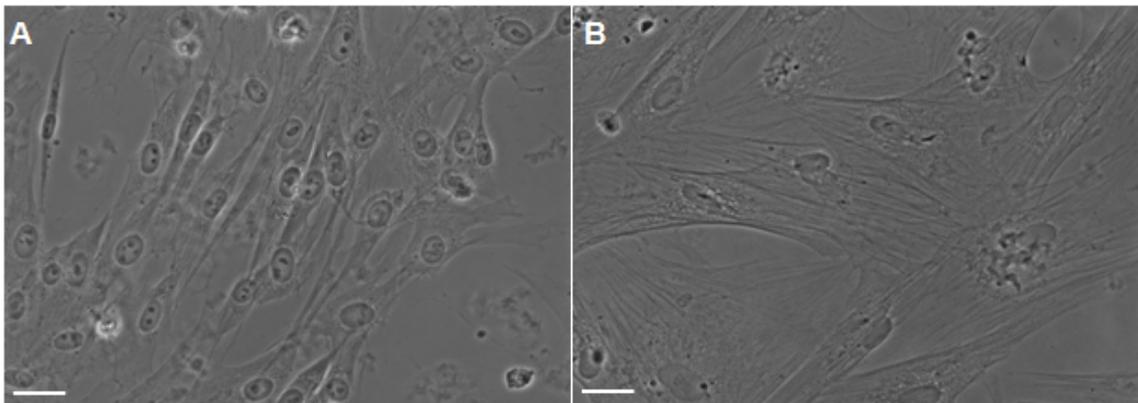


Abbildung 5.5. Phasenkontrastaufnahmen von undifferenzierten (UCMSC) und kardiomyogen differenzierten UCMSC (cUCMSC). UCMSC zeigen die charakteristische fibroblastoide Morphologie (A) im Gegensatz zum flächigen Erscheinungsbild von cUCMSC mit gestreiften, filamentösen Zytoplasma (B). Die Abbildungen sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente mit UCMSC und cUCMSC von sechs unterschiedlichen Nabelschnüren. Maßstabsbalken = 50 μm ; Vergrößerung 400 x.

5.2.2 Expression kardialer Proteine

UCMSC wurden gemäß sechs bereits veröffentlichter Protokolle kardiomyogen differenziert (siehe 4.3). Für eine anschließende immunzytochemische Untersuchung (siehe 4.6.8), wurden cUCMSC gegen kardiale und skelettale Proteine gefärbt. Nachfolgende Tabelle fasst dabei die gesamte Analyse zusammen. Dabei sind positive Färbungen in grün und negative Färbungen in rot dargestellt. Einige Färbungen im Anschluss an die Differenzierung gemäß Goumans et al., Maltsev et al. und Wang et al. waren aufgrund unzureichender Zellzahlen nicht auswertbar und wurden daher als „nicht verfügbar“ (n. v.) gekennzeichnet.

Differenzierung nach	UC	cA	cAn	cTnC	cTnT	Cx43	GATA4	MYH	sA	sAn	sM
Goumans et al.	1	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	2	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Matsuura et al. I	1	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	2	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
	4	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Matsuura et al. II	1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
	4	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
	5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	6	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Maltsev et al.	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
	3	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
	4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
	5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
	6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.	n.v.
Wang et al.	1	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	2	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	3	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	4	-	-	-	n.v.	+	-	-	+	-	-
	5	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	6	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Wu et al.	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	5	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-

cA = cardiac Actin	cTnT = cardiac Troponin T	MYH = Myosin Heavy Chain	sM = slow Myosin	+
cAn = cardiac Actinin	Cx43 = Connexin 43	sA = sarcomeric Actin	-	
cTnC = cardiac Troponin C	GATA4 = GATA4		n.v.	

Tabelle 5.1. Zusammenfassung der immunozytochemischen Charakterisierung der kardiomyogenen Differenzierung von UCMSC (cUCMSC) nach sechs verschiedenen Protokollen. Der Grad der Expression kardialer Marker ist vom Differenzierungsprotokoll und der Nabelschnur abhängig. Die Protokolle nach Goumans et al. [49], Matsuura et al. Protokoll I [83], Wang et al. [136] und Wu et al. [146] verwenden 5-Azacytidin zur kardiomyogenen Differenzierung verschiedener Stammzelltypen. Das Protokoll nach Matsuura et al. II [83] beschreibt die kardiomyogene Differenzierung von Sca-1+ murinen Herzzellen, das von Maltsev et al. [77] die von murinen embryonalen Stammzellen. Grün hervorgehobene Felder unterscheiden positive Färbungen von roten Feldern mit negativen Färbungen. n. v.: nicht verfügbar = cUCMSC in unzureichender Zellzahl für immunzytochemische Analysen. (Gouman et al., Maltsev et al.) bzw. nicht auswertbare Färbungen an cUCMSC (Wang et al.). Daten sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente mit cUCMSC von sechs unterschiedlichen Nabelschnüren (UC).

Gemäß Matsuura et al. Protokoll II [83] wurden Sca-1+ Zellen aus adulten murinen Herzen (Herzstammzellen) mittels Oxytocin kardiomyogen differenziert. Dieses Vorgehen stellte sich bei cUCMSC hinsichtlich der Expression kardialer Proteine gegenüber anderen untersuchten Protokollen als überlegen heraus. Goumans et al. [49], Matsuura et al. Protokoll I [83], Wang et al. [136], sowie Wu et al. [146] beschreiben die kardiomyogene Differenzierung verschiedener Stammzellen durch die Verwendung

von 5-Azazytidin, was sich für die Generierung von cUCMSC wie auch die von Maltsev et al. [77] beschriebene Bildung von “embryoid bodies“ als weniger effektiv erwies.

Die kardialen Marker, kardiales Aktin, kardiales Aktinin, sarkomerisches Aktin, sarkomerisches Aktinin und Connexin 43 werden nach Differenzierung bei allen untersuchten Protokollen exprimiert. Die Expression kardialer Proteine durch cUCMSC variiert allerdings zwischen den verwendeten Nabelschnüren und deutet somit auf spenderabhängige Unterschiede im Differenzierungsprotokoll hin. Nach Wu et al. differenzierte cUCMSC exprimieren zusätzlich das kardiale Protein Myosin Heavy Chain. Neben den zuvor genannten Proteinen zeigte sowohl die Differenzierung nach Matsuura et al. Protokoll I mittels 5-Azazytidin als auch Differenzierungen nach Matsuura et al. Protokoll II mittels Oxytocin die Expression von kardialem Troponin T. Die durch Oxytocin (Matsuura Protokoll II) induzierte kardiomyogene Differenzierung von UCMSC führt jedoch zu einer häufigeren Expression von spezifischen kardialen Markern als die Differenzierung mittels 5-Azazytidin (Matsuura Protokoll I). Unabhängig vom jeweiligen Differenzierungsprotokoll wurde die Expression von kardialem Troponin C, GATA4 und slow Myosin nicht detektiert. Die Differenzierung gemäß Goumans et al. (Abbildung 5.6 A) und Maltsev et al. (Abbildung 5.6 B) generierte nur unzureichende Zellzahlen an cUCMSC für eine umfassende immunzytochemische Analyse.

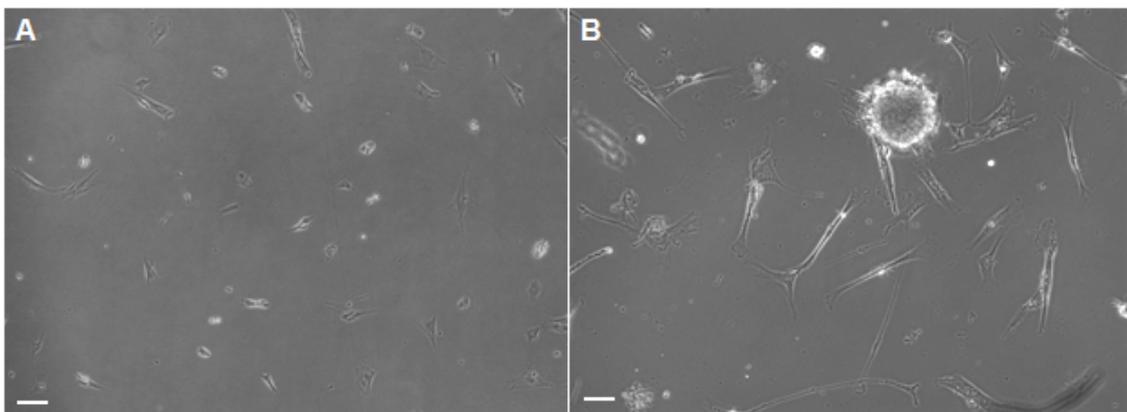


Abbildung 5.6. Phasenkontrastaufnahmen von kardiomyogen differenzierten UCMSC (cUCMSC) geringer Zelldichte. Die kardiomyogene Differenzierung nach Goumans et al. (A, [49]) und Maltsev et al. (B, [77]) führt zu unzureichenden Zellzahlen für immunzytochemische Analysen. Die Abbildungen sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente mit UCMSC und cUCMSC von sechs unterschiedlichen Nabelschnüren. Maßstabsbalken: A = 50 μm , B = 100 μm ; Vergrößerung A = 50, B = 100 x.

Wie aus obiger Tabelle 5.1 ersichtlich, erzielt die kardiomyogene Differenzierung von UCMSC gemäß Protokoll II nach Matsuura et al. die höchste Anzahl an kardialen Markern. Die Induktion der kardiomyogenen Differenzierung mittels Oxytocin wird dadurch als effizienteste Differenzierungsmethode erachtet. Die cUCMSC zeigten die

Expression von kardialen Aktin, kardialen Aktinin, kardialen Troponin C, kardialen Troponin T, Connexin 43, sarkomerischen Aktin, sarkomerischen Aktinin sowie Myosin Heavy Chain (Abbildung 5.7 E-H, L-M). Die Färbungen gegen kardiales Aktin, kardiales Aktinin, kardiales Troponin C, kardiales Troponin T, sarkomerisches Aktin, sarkomerisches Aktinin und Myosin Heavy Chain weisen ein fein gestreiftes Muster auf, welches auf die Formation von Sarkomeren hindeutet. Des Weiteren exprimieren cUCMSC Connexin 43 zur potentiellen elektrischen Kopplung zwischen Zellen (Abbildung 5.7 N,O). Als Kontrolle verwendete, undifferenzierte UCMSC zeigen eine vernachlässigbare Färbung bezüglich sämtlicher kardialen Antigene (Abbildung 5.7 A-D, I-K).

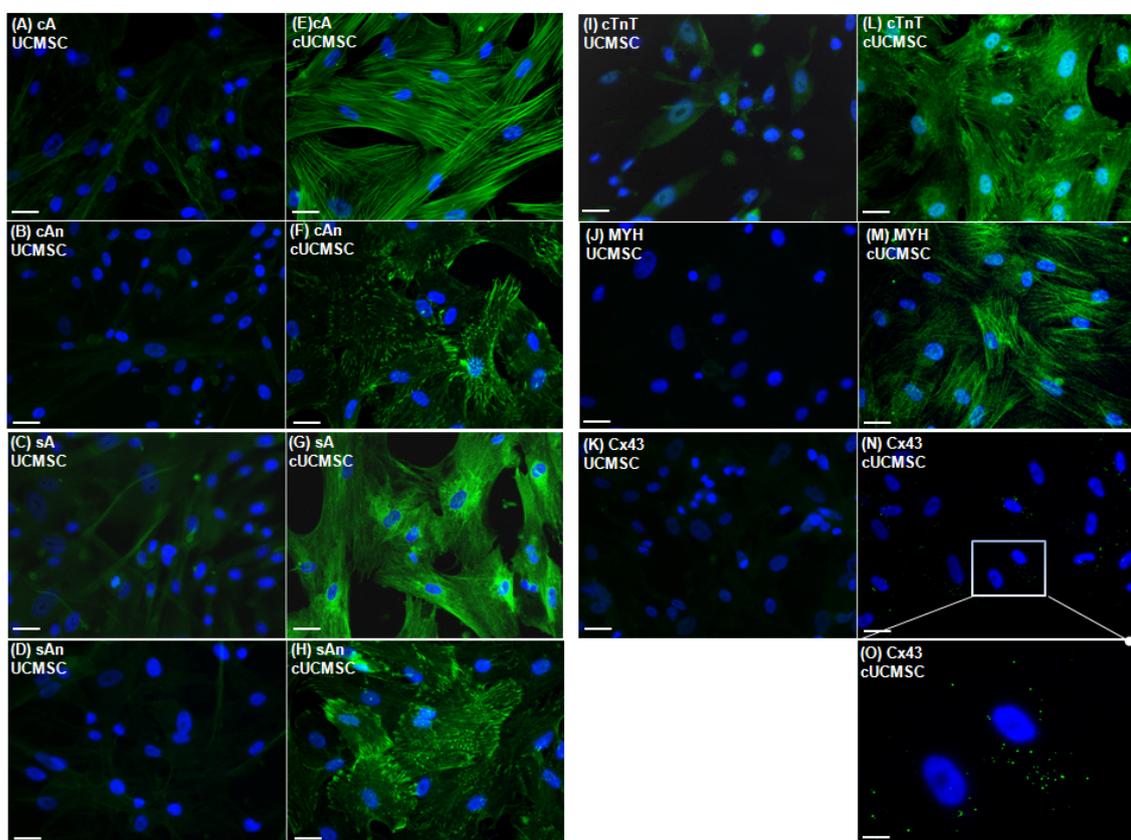


Abbildung 5.7. Immunzytochemische Analyse von cUCMSC differenziert nach Matsuura et al. Protokoll II. cUCMSC exprimieren die kontraktile Proteine kardiales Aktin (cA), kardiales Aktinin (cAn), sarkomerisches Aktin (sA), sarkomerisches Aktinin (sAn), kardiales Troponin T (cTnT), Myosin Heavy Chain (MYH) (E-H, L-M;) sowie das intrazelluläre Kanalprotein Connexin 43 (Cx43) (N,O; grün) zur elektrischen Zell-Zell-Kopplung. Undifferenzierte UCMSC exprimieren keinerlei kardiale Proteine (A-D, I-K). Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt (A-O; blau). Die Abbildungen sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente mit UCMSC und cUCMSC von sechs unterschiedlichen Nabelschnüren. Maßstabsbalken A-N = 50 µm, O = 25 µm; Vergrößerung: A-N = 400 x; O = zoom von N.

5.3 Besiedelung von Zellträgern *in vitro*

Nachfolgende Untersuchungen sind in einer Vorveröffentlichung niedergelegt [53].

5.3.1 Anwachsrate nach statischer Besiedelung

Um die Effizienz einer Titanisierung von ePTFE Zellträgern für die Anwachsrate von UCMSC zu evaluieren, wurden die Zellen auf unbeschichtete und titanisierte Zellträger ausgesät (siehe 4.4.5). Die adhärenen UCMSC wurden 24 h nach Inkubation, wie unter 4.6.4 beschrieben, fluoreszenzmarkiert und quantifiziert. Dazu wurde der prozentuale Anteil adhärenen UCMSC bestimmt und auf den Prozentsatz von UCMSC, die in Standard-Zellkulturplatten aus Polystyren adhärenen, normiert. In Abbildung 5.8 sind die daraus resultierenden Anwachsrate dargestellt.

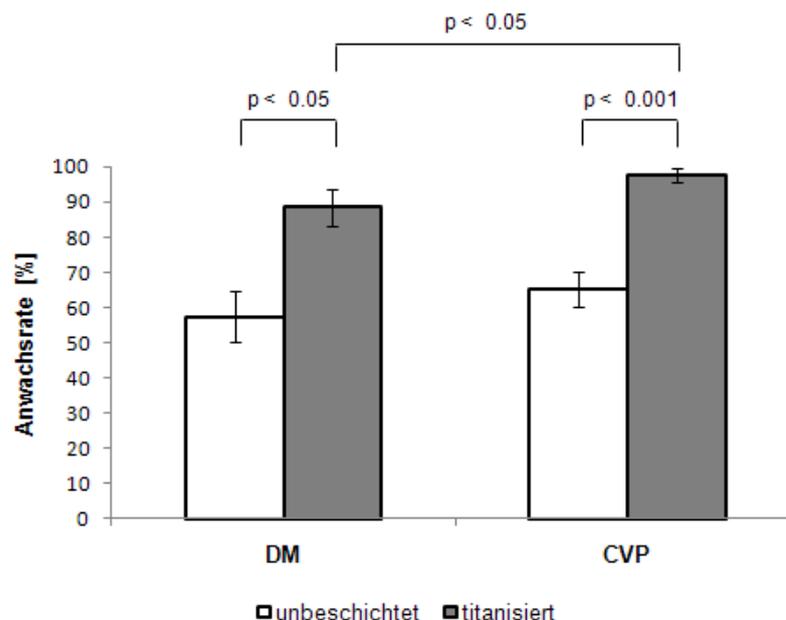


Abbildung 5.8. Anwachsrate von UCMSC auf unbeschichteten sowie titanisierten DM und CVP. UCMSC adhärenen auf titanisierten Zellträgern signifikant besser. Die höchsten Anwachsrate zeigen sich auf titanisierten CVP ($p < 0,05$). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von Einzelwerten dreier unterschiedlicher Nabelschnurproben \pm Standardabweichung dar.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich wird, ist die Anwachsrate auf titanisierten signifikant höher als auf unbeschichteten Zellträgern. Durch die Titanbeschichtung wird die Benetzbarkeit der Zellträger bei unveränderter Oberflächentopographie erhöht. Obwohl beide Zellträger chemisch identisch sind und sich nur in der Oberflächenstruktur unterscheiden, wurde im Vergleich zu titanisierten DM eine signifikant höhere Anwachsrate auf titanisierten CVP erzielt. Dies deutet auf einen Vorteil für eine homogen poröse Oberfläche im Gegensatz zu einer gerippten porösen Oberfläche hin.

5.3.2 Vitalität nach statischer Besiedelung

Zur Bestimmung der Vitalität von UCMSC nach Aussaat auf unbeschichteten und titanisierten Zellträgern wurde ein LIVE/DEAD® Test durchgeführt. Dazu wurden, wie unter 4.6.5 beschrieben, 7×10^2 UCMSC/mm² auf DM und CVP ausgesät. 24 h nach Inkubation wurde der prozentuale Anteil letaler Zellen bestimmt und daraus der Prozentsatz vitaler Zellen hochgerechnet. Dieser Prozentsatz wurde dann auf den Prozentsatz vitaler UCMSC in Standard-Zellkulturplatten aus Polystyren normiert. Aus Abbildung 5.9 wird dabei ein signifikant höherer Anteil an vitalen UCMSC auf titanisierten Zellträgern als auf unbeschichteten Zellträgern ersichtlich.

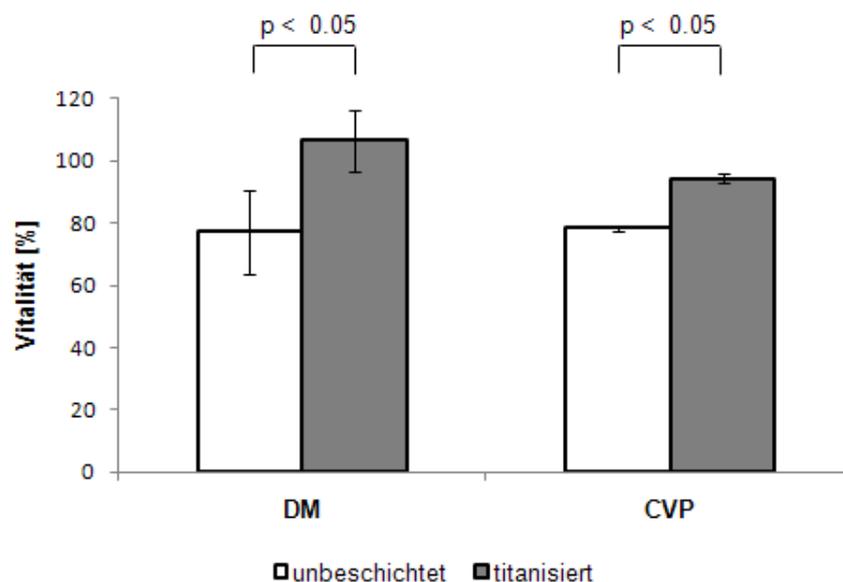


Abbildung 5.9. Quantitative Bestimmung der Vitalität von UCMSC auf unbeschichteten sowie titanisierten DM und CVP nach LIVE/DEAD® Färbung. Titanisierte Zellträger weisen eine höhere Anzahl an vitalen UCMSC als unbeschichtete Zellträger auf ($p < 0,05$). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von Einzelwerten dreier unterschiedlicher Nabelschnurproben \pm Standardabweichung dar

Dies wird auch durch repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach LIVE/DEAD® Färbungen in Abbildung 5.10 bestätigt. UCMSC zeigen ihre charakteristische langgestreckte spindelförmige Morphologie auf titanisierten Zellträgern im Vergleich zu kugelförmigen Zellagglomeraten auf unbeschichteten Zellträgern.

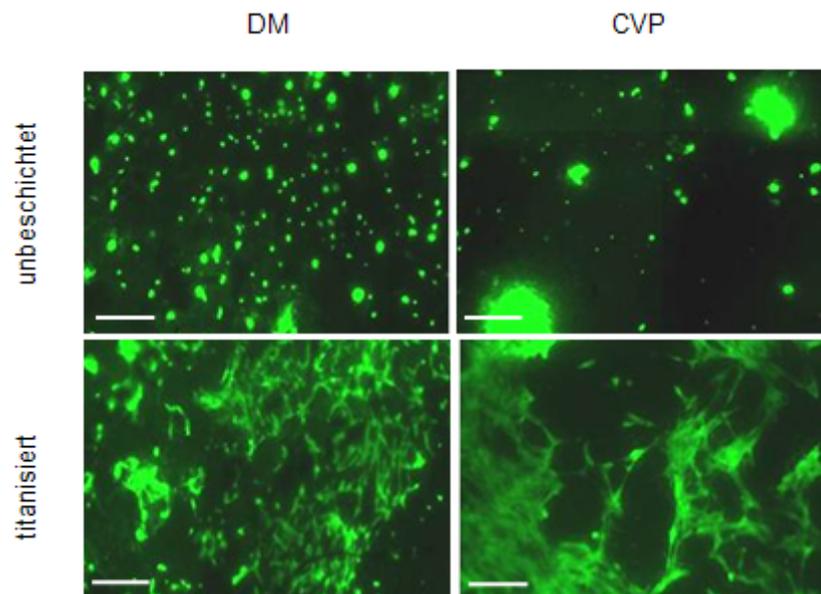


Abbildung 5.10. Fluoreszenzaufnahmen der LIVE/DEAD® Färbung zur qualitativen Bestimmung der Vitalität von UCMSC auf unbeschichteten sowie titanisierten DM und CVP. Der hier abgebildete Fluoreszenzkanal zeigt vitale UCMSC (grüne Färbung) auf titanisierten CVP in ihrer typischen fibroblastoiden Morphologie, was darauf hindeutet, dass die Titanisierung in Kombination mit der Homogenität des CVP für die Zellen eine physiologische Oberfläche schafft. Die Abbildungen sind repräsentativ für UCMSC von drei unterschiedlichen Nabelschnüren. Maßstabsbalken = 200 μm (Vergrößerung 100 x)

5.3.3 Proliferationskapazität nach statischer Besiedelung

Die Proliferationskapazität von UCMSC auf unbeschichteten und titanisierten DM sowie CVP wurde über 72 h mittels eines WST-1 Proliferationsassays (siehe 4.6.6) analysiert. Die optische Dichte (OD) wurde dabei als Maß der UCMSC Proliferation herangezogen. Die OD von UCMSC auf Zellträgern wurden auf die OD von UCMSC in Standard-Zellkulturplatten normiert. Die daraus resultierenden Werte der relativen OD sind in Abbildung 5.11 dargestellt.

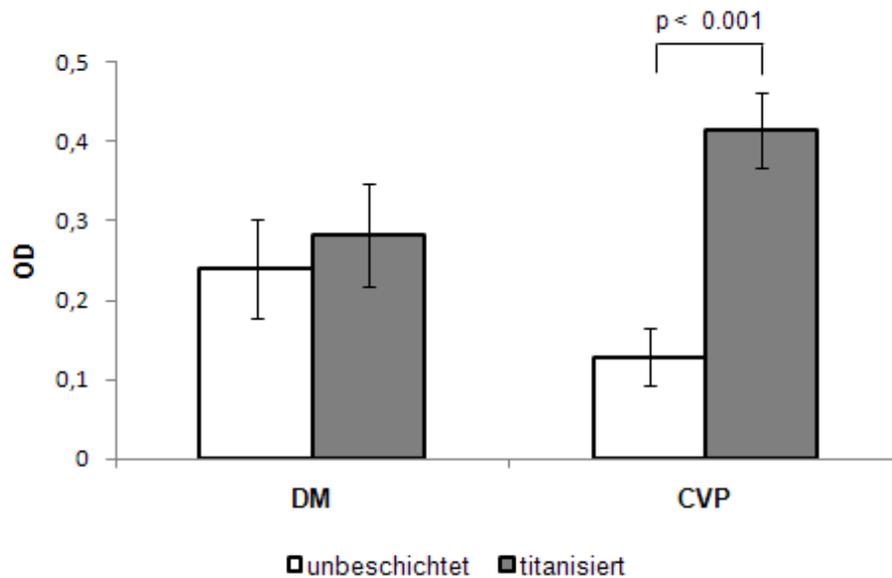


Abbildung 5.11. Proliferationskapazität von UCMSC auf unbeschichteten und titanisierten DM sowie CVP. Titanisierte Zellträger, insbesondere titanisiertes CVP begünstigen die Proliferation von UCMSC ($p < 0,01$). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von Einzelwerten dreier unterschiedlicher Nabelschnurproben \pm Standardabweichung dar.

Wie die Ergebnisse der Anwachsrate (Abbildung 5.8) und der Vitalität (Abbildung 5.9, 5.10) erwarten ließen, zeigten UCMSC auf titanisierten Zellträgern höhere OD-Werte und somit eine höhere Proliferation als UCMSC auf unbeschichteten Zellträgern.

5.3.4 Morphologie nach statischer Besiedelung

Die Besiedelung der unbeschichteten und beschichteten Zellträger wurde wie unter 4.4.5 beschrieben durchgeführt. Die Morphologie der UCMSC wurde 24 h nach Aussaat rasterelektronenmikroskopisch (siehe 4.6.7) untersucht.

Abbildung 5.12 (A, B) zeigt eine geringfügige Adhäsion von UCMSC auf unbeschichteten DM und CVP. Bei näherer Betrachtung von unbeschichteten CVP ist eine kugelförmige Morphologie der UCMSC deutlich erkennbar (Abbildung 5.12 C). Titanisierte Zellträger weisen die gleiche poröse, faserige Struktur wie unbeschichtete Zellträger auf. In Kontakt mit Luft bildet sich allerdings an Titanbeschichtungen eine Titandioxid-Schicht, welche die Oberflächenenergie erhöht und somit hervorragende hydrophile Eigenschaften hervorruft. Die Aufnahmen in Abbildung 5.12 (D, E) zeigen die typische langgestreckte fibroblastoide Morphologie der UCMSC (Pfeile) auf titanisierten Zellträgern und ähneln damit UCMSC in herkömmlichen Zellkulturflaschen (*tissue culture polystyrene*, TC-PS; Abbildung 5.12 G). Wie aus Abbildung 5.12 (E) zudem ersichtlich, wird titanisiertes CVP homogen von einem Zellrasen bedeckt. Dabei indizieren Lamellopodien der UCMSC eine Akzeptanz des titanisierten CVP als Substrat (Abbildung 5.12 F).

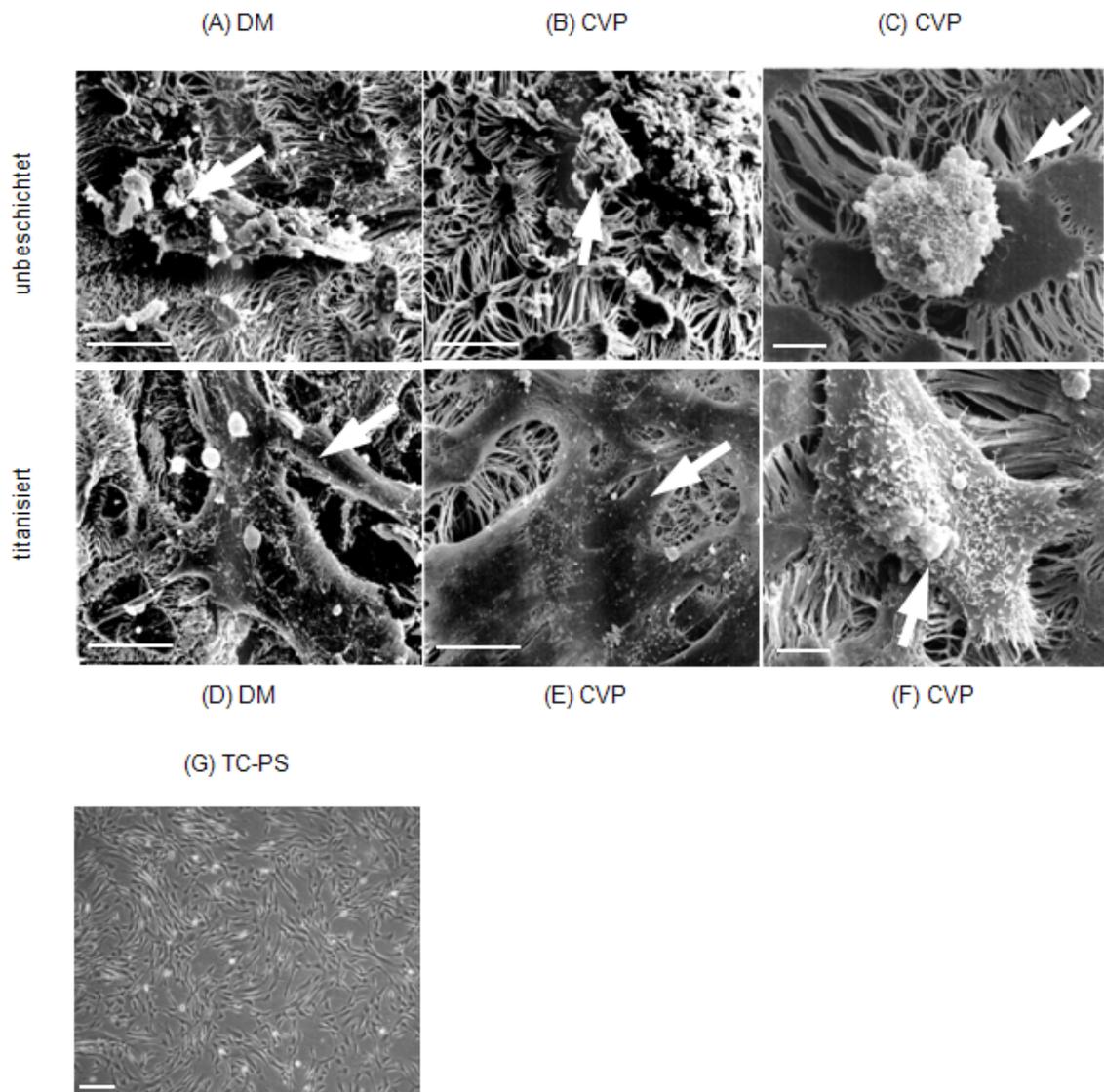


Abbildung 5.12. REM-Aufnahmen von UCMSC auf unbeschichteten sowie titanisierten DM und CVP. UCMSC auf unbeschichteten Zellträgern zeigen eine kugelförmige Morphologie (A-C, Pfeile). Dagegen weisen UCMSC auf titanisierten Zellträgern ihre charakteristische fibroblastoide Morphologie auf (D-F, Pfeile). Titanisiertes CVP ermöglicht eine homogene Besiedelung mit UCMSC (E), die zudem Lamellopodien zeigen (F). Die Aufnahmen sind repräsentativ für UCMSC von drei verschiedenen Nabelschnüren. Maßstabsbalken A, B, D, E = 50 μm (Vergrößerung 1000 \times); C, F = 10 μm (Vergrößerung 2000 \times). In Phasenkontrastaufnahmen zeigen sich UCMSC auf kommerziell erhältlichen TC-PS in typischer Fibroblasten-ähnlicher Morphologie (G). Maßstabsbalken = 200 μm .

5.4 Bioreaktor-Konzeptstudie

Die Entwicklung eines pulsatilen Bioreaktors erfolgte über die theoretische Konzeption zweier Generationen an Bioreaktoren bis hin zum funktionstüchtigen Bioreaktor der 3. Generation.

5.4.1 Bioreaktor der 1. Generation

Design

Die Kerneinheit des Bioreaktors der 1. Generation (siehe Abbildung 5.13) besteht aus einem Medienkompartiment (2), einer Probenmembran (3), einer Pulsmembran (5) und einem Druckkompartiment (6) mit Druckanschluss (7). Das sterile Medienkompartiment wird durch die zwei sterilen Membranen vom unsterilen Druckkompartiment getrennt. Die dem Medienkompartiment zugewandte Probenmembran wird durch einen ringförmigen Abstandshalter (4) von der dem Druckkompartiment zugewandten Pulsmembran getrennt. Die Fixierung besiedelter Zellträger (7,5 mm x 7,5 mm) erfolgt in vorgefertigten Aussparungen auf der Unterseite der Probenmembran mittels Pins. Ein Luer-Lock-Anschluss mit M5-Gewinde (1) am Medienkompartiment ermöglicht dessen Befüllung mit Medium sowie das Anbringen eines Sterilfilters zur Begasung.

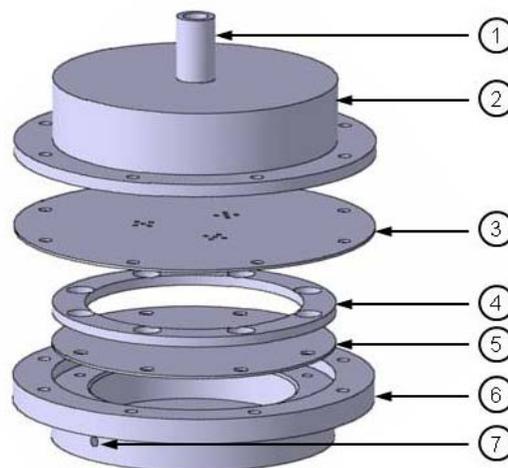


Abbildung 5.13. Kerneinheit des Bioreaktors der 1. Generation. Luer-Lock-Anschluss mit M5-Gewinde (1), Medienkompartiment (2), Probenmembran (3), Abstandshalter (4), Pulsmembran (5), Druckkompartiment (6), Druckanschluss (7). Durch die Erzeugung eines pulsatilen Druckes im Druckkompartiment kommt es Wölbung der Pulsmembran wodurch die besiedelten Zellträger auf der Probenmembran abrasiver Belastung unterliegen. Die Nährstoffversorgung der Zellträger erfolgt über Medium im Medienkompartiment. Bei Betrieb des Reaktors in einem konventionellen Brutschrank, erfolgt die Temperaturversorgung sowie die CO₂-versorgung der besiedelten Zellträger über Sterilfilter am Luer-Lock-Anschluss. Maßstab 1:3

Funktionsbeschreibung

Im ersten Entwurf des Bioreaktors wird eine wechselnde Kompression und Entspannung von Luft im Druckkompartiment erzeugt, wodurch es zur Pulsation der auf dem Druckkompartiment befestigten Pulsmembran kommt. Durch die Wölbung der Pulsmembran unterliegen die auf der Probenmembran befestigten Zellträger abrasiver mechanischer Belastung. Die Nährstoffversorgung der besiedelten Zellträger wird durch Zellkulturmedium im Medienkompartiment gewährleistet. Durch den Luer-Lock-Anschluss am Medienkompartiment wird die Befüllung mit frischem Kulturmedium ermöglicht. Bei Betrieb des Bioreaktors in einem konventionellen Brutschrank bei 37 °C/5 % CO₂ ist die Temperatur- und CO₂-Versorgung der Zellen über einen Sterilfilter am Luer-Lock-Anschluss gegeben.

5.4.2 Bioreaktor der 2. Generation

Design

Die Kerneinheit des Bioreaktors der 2. Generation (siehe Abbildung 5.14) besteht aus einem Medienkompartiment (2), drei Clipsystemen (4) mit je einer Pulsmembran, einem Probenkompartiment (5) sowie einem Druckkompartiment (6) mit Druckanschluss (7). Das sterile, zylindrische Medienkompartiment ist durch drei sterile Pulsmembranen vom unsterilen Probenkompartiment getrennt und über Luer-Lock-Anschlüsse (1) mit Medium befüllbar. Die drei Pulsmembranen sind dabei jeweils mit einem besiedelten Zellträger (7,5 mm x 7,5 mm) in einem Clipsystem befestigt und werden zur Fixierung im Probenkompartiment verschraubt. Das Probenkompartiment ist wiederum auf das zylindrische Druckkompartiment aufgeschraubt.

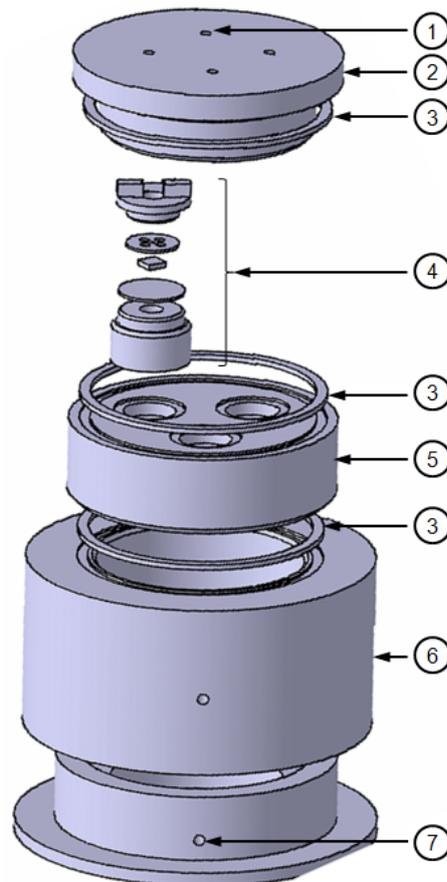


Abbildung 5.14. Kerneinheit des Bioreaktors der 2. Generation. Luer-Lock-Anschlüsse mit M5-Gewinde (1), Medienkompartiment (2), Dichtungsring (3), Clipsystem (4), Probenkompartiment (5), Druckkompartiment (6), Druckanschluss (7). Durch die Erzeugung eines pulsatischen Druckes im Druckkompartiment kommt es Wölbung der Pulsmembranen in den Clipsystemen wodurch die ebenfalls in den Clipsystemen befestigten Zellträger abrasiver Belastung unterliegen. Die Nährstoffversorgung der Zellträger erfolgt über Medium im Medienkompartiment. Bei Betrieb des Reaktors in einem konventionellen Brutschrank, erfolgt die Temperaturversorgung sowie die CO₂-Versorgung der besiedelten Zellträger über Sterilfilter am Luer-Lock-Anschluss. Maßstab 1:3

Funktionsbeschreibung

Im Druckkompartiment des überarbeiteten Nachfolge-Modells wird Luft abwechselnd komprimiert und entspannt, um eine herzähnliche Pulsation von nun drei separaten Pulsmembranen im Probenkompartiment herbeizuführen. Jede dieser Pulsmembranen wird zusammen mit einem besiedelten Zellträger durch das in Abbildung 5.15 dargestellte Clipsystem im Probenkompartiment befestigt. Dazu wird der besiedelte Zellträger (3) mit chirurgischem Nahtmaterial an der Nahtschablone (2) befestigt, wobei die unbesiedelte Seite des Zellträgers der Nahtschablone und die besiedelte Seite der Pulsmembran (4) zugewandt ist. Der an der Nahtschablone fixierte Zellträger wird zusammen mit der Pulsmembran durch das Clip-Oberteil (1) und das Clip-Unterteil (5) befestigt. Bei Pulsation der Pulsmembran wird damit der besiedelte Zellträger mechanisch belastet.

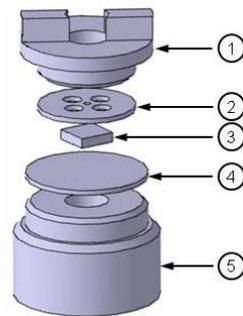


Abbildung 5.15. Clipsystem des Bioreaktors der 2. Generation. Clip-Oberteil (1), Nahtschablone (2), besiedelter Zellträger (3), Pulsmembran (4), Clip-Unterteil (5). Der besiedelte Zellträger wird mit chirurgischem Nahtmaterial an der Nahtschablone befestigt, wobei die unbesiedelte Seite des Zellträgers der Nahtschablone und die besiedelte Seite der Pulsmembran zugewandt ist. Der an der Nahtschablone fixierte Zellträger wird zusammen mit der Pulsmembran durch das Clip-Oberteil und das Clip-Unterteil befestigt. Maßstab 1:1,5

Die Nährstoffversorgung der besiedelten Zellträger wird durch Zellkulturmedium im Medienkompartiment gewährleistet. Durch Luer-Lock-Anschlüsse am Medienkompartiment wird die Entnahme von verbrauchtem Kulturmedium sowie die Befüllung mit frischem Kulturmedium ermöglicht. Die Temperatur- und CO₂-Versorgung der Zellen ist unter Brutschrankbedingungen über Sterilfilter am Medienkompartiment gegeben.

5.4.3 Bioreaktor der 3. Generation

Design

Der Bioreaktor der 3. Generation (siehe Abbildung 5.16) besteht aus der Kerneinheit mit drei Medienkompartimenten (3), drei Clipsystemen (5) mit je einer Pulsmembran, einem Probenkompartiment (6) sowie einem Druckkompartiment (7) und der Antriebseinheit (9).

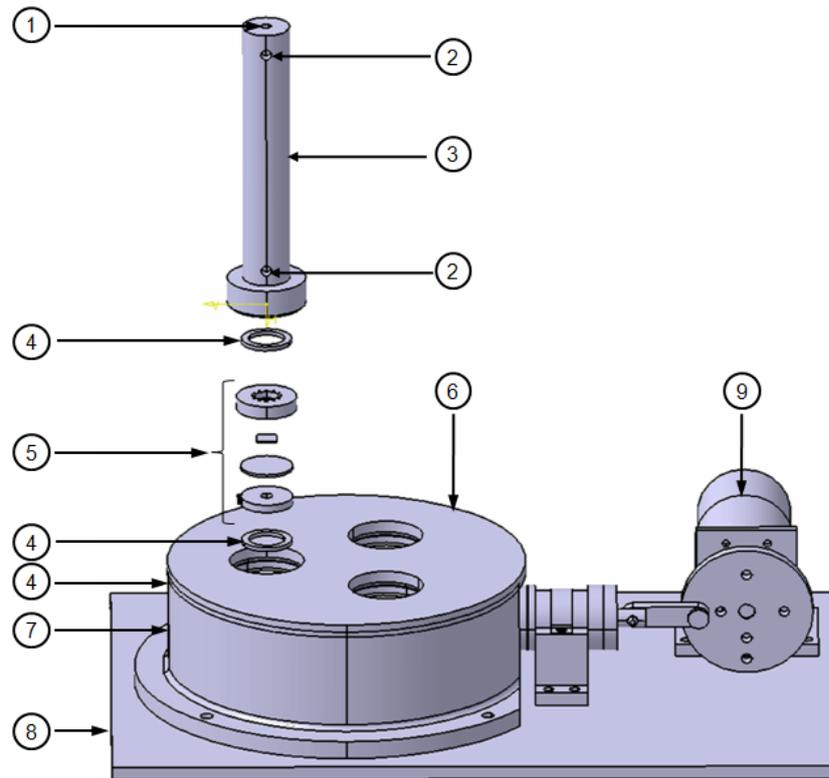


Abbildung 5.16. Bioreaktor der 3. Generation. Luer-Lock-Anschluss für einen Sterilfilter zur CO₂-Begasung (1), Luer-Lock-Anschlüsse zur Medienzugabe bzw. zur Medienentnahme (2), Medienkompartiment (3), Dichtungsring (4), Clipsystem (5), Probenkompartiment (6), Druckkompartiment (7), Bodenplatte (8), Antriebseinheit (9). Durch die Erzeugung eines pulsartigen Druckes im Druckkompartiment kommt es zu einer Wölbung der Pulsmembranen in den Clipsystemen, wodurch die ebenfalls in den Clipsystemen befestigten Zellträger abrasiver Belastung unterliegen. Die Nährstoffversorgung der Zellträger erfolgt über Medium im Medienkompartiment. Bei Betrieb des Reaktors in einem konventionellen Brutschrank, erfolgt die Temperaturversorgung sowie die CO₂-Versorgung der besiedelten Zellträger über einen Sterilfilter am Luer-Lock-Anschluss. Maßstab 1:3.

a) Kerneinheit

Die sterilen, zylindrischen Medienkompartimente ($d_a = 20$ mm, $d_i = 10$ mm, $h_a = 115$ mm, $h_i = 100$ mm) sind jeweils durch eine sterile Pulsmembran ($d = 20$ mm; Stärke = 0,5 mm) vom unsterilen Probenkompartiment ($d = 135$ mm, $h = 20$ mm) getrennt und über Luer-Lock-Anschlüsse (2) mit Medium ($V_{\max} = 7,85$ ml) befüllbar. Die drei Pulsmembranen sind dabei jeweils mit einem besiedelten Zellträger (7,5 x 7,5 mm, siehe 4.4.6) in einem Clipsystem ($d = 23$ mm, $h = 6$ mm) befestigt. Die bestückten Clipsysteme sind durch Verschrauben der Medienkompartimente im Probenkompartiment befestigt. Das Probenkompartiment ist wiederum auf das zylindrische Druckkompartiment ($d_a = 135$ mm, $d_i = 110$ mm, $h_a = 40$ mm, $h_i = 5$ mm) aufgeschraubt, welches mit dem Antrieb verbunden ist.

b) Antriebseinheit

Der Antrieb (siehe Abbildung 5.17) besteht aus einem elektrischen Getriebemotor (1; Datenblätter siehe Anhang C, D) mit regulierbarer Drehzahl (Datenblatt siehe Anhang E), der über einen Exzenter (2; $d = 50 \text{ mm}$, $h = 5 \text{ mm}$) eine Verbindungsstange (3; $55 \times 7 \times 5 \text{ mm}$) bewegt. Die Verbindungsstange ist über eine Kolbenstange ($d = 8 \text{ mm}$, $h = 50 \text{ mm}$) mit einem Hubkolben ($d_h = 12 \text{ mm}$) verbunden, woraus eine horizontale Bewegung des Kolbens in einem Zylinder (4; $d_a = 25 \text{ mm}$, $d_i = 13 \text{ mm}$, $h_z = 30 \text{ mm}$) resultiert. Das verdrängte Hubvolumen ($V_h = (d_h^2 \cdot \pi / 4) \cdot h_z$) beträgt dabei $3,4 \text{ cm}^3$ und wird zur Auslenkung der drei Pulsmembranen gleichmäßig aufgeteilt. Der Zylinder ist wiederum mit dem Druckkompartiment verbunden, worin ein pulsatile Druck bei einer Frequenz von 1-65 bpm erzeugt werden kann.

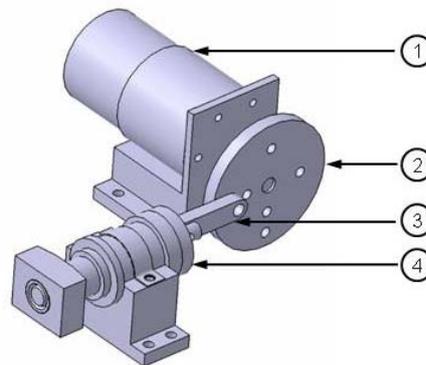


Abbildung 5.17. Antriebseinheit des Bioreaktors der 3. Generation. Getriebemotor (1), Exzenter (2), Verbindungsstange (3), Zylinder (4) mit Hubkolben. Die regulierbare Antriebseinheit erzeugt einen pulsatile Druck bei einer Frequenz von 1-65 bpm. Maßstab 1:3

Funktionsbeschreibung

In der finalen Modellversion wird der Kolben zur wechselnden Kompression und Entspannung von Luft im Druckkompartiment bewegt. Erreicht der Kolben den oberen Totpunkt, ist der Druck im Druckkompartiment maximal und die in den Clipsystemen fixierten Pulsmembranen im Probenkompartiment wölben sich aus, um den Druckgradienten auszugleichen. Erreicht der Kolben den unteren Totpunkt, so besteht kein Druckgradient und die Pulsmembranen relaxieren, wodurch eine Simulation des pulsierenden Herzens erzielt wird. Jede dieser Pulsmembranen wird zusammen mit einem besiedelten Zellträger (3) durch das in Abbildung 5.18 dargestellte Clipsystem bestehend aus Clip-Oberteil (1; $d_a = 23 \text{ mm}$, $d_i = 9 \text{ mm}$, $h = 5 \text{ mm}$), Pulsmembran (2), und Clip-Unterteil (4; $d_a = 20 \text{ mm}$, $d_i = 11 \text{ mm}$, $h = 3 \text{ mm}$) im Probenkompartiment befestigt. Der Zellträger wird dazu zunächst mit der besiedelten Seite zentriert auf die Pulsmembran aufgelegt (A). Die Pulsmembran wird dann so in das Clip-Oberteil eingelegt, dass sich der durch Kapillarkräfte anhaftenden Zellträger zwischen Clip-Oberteil und Pulsmembran befindet (B). Das System wird letztlich mit dem Clip-Unterteil verschlossen (C) und in umgekehrter Orientierung (D) in der Kerneinheit des

Bioreaktors befestigt.

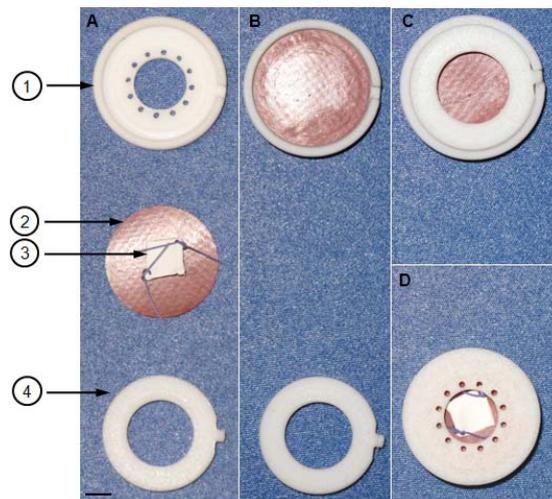


Abbildung 5.18. Clipsystem des Bioreaktors der 3. Generation. Clip-Oberteil (1), Pulsmembran (2), besiedelter Zellträger (3), Clip-Unterteil (4). Der besiedelte Zellträger wird mit der besiedelten Seite auf die Pulsmembran aufgelegt (A). Die Pulsmembran wird dann so in das Clip-Oberteil eingelegt, dass sich der Zellträger zwischen Clip-Oberteil und Pulsmembran befindet (B). Das System wird mit dem Clip-Unterteil verschlossen (C) und in umgekehrter Orientierung (D) in das Probenkompartiment eingebracht. Maßstabsbalken = 0,4 cm.

Die Nährstoffversorgung der besiedelten Zellträger wird durch Zellkulturmedium in den Medienkompartimenten gewährleistet. Durch Luer-Lock-Anschlüsse an den Medienkompartimenten wird die Entnahme von verbrauchtem Kulturmedium sowie die Befüllung mit frischem Kulturmedium ermöglicht. Bei Betrieb des Bioreaktors (siehe Abbildung 5.19) in einem konventionellen Brutschrank bei 37°C / 5 % CO₂ ist die Temperatur- und CO₂-Versorgung der Zellen über Sterilfilter an den Medienkompartimenten gegeben.



Abbildung 5.19. Prototyp des Bioreaktors der 3. Generation. Durch die parallele mechanische Belastung von drei Zellträgern werden Direktvergleiche unter identischer Belastung gewährleistet. Die Fertigung der Kerneinheit des Bioreaktors aus Plexiglas ermöglicht eine makroskopische Beobachtung der Vorgänge im Inneren. Maßstabsbalken = 2 cm.

Funktionelles Zusammenwirken der Bioreaktor-Komponenten

Die Montage des Bioreaktors erfolgt unter sterilen Bedingungen wie in Abbildung 5.20 beschrieben.

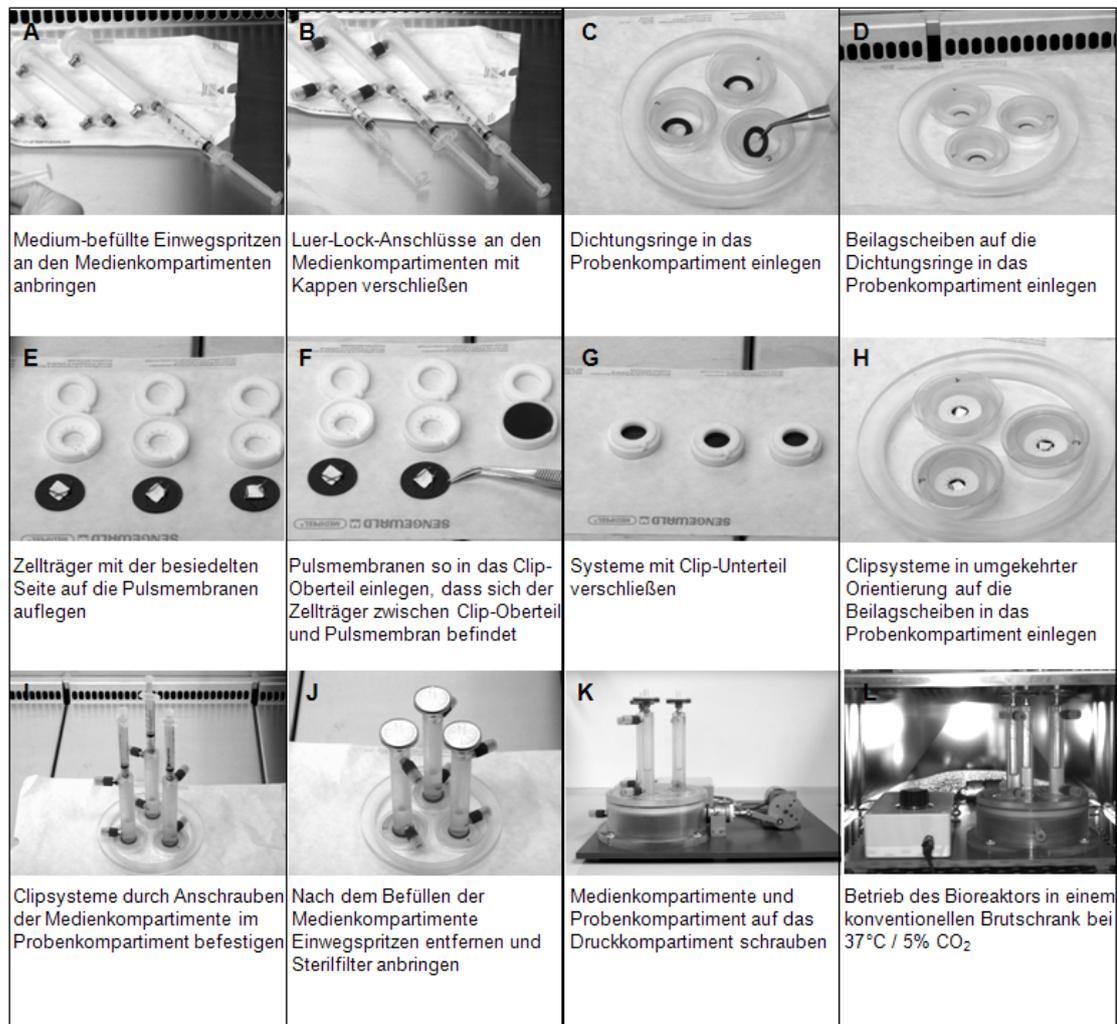


Abbildung 5.20. Funktionelles Zusammenwirken der Bioreaktor-Komponenten der 3. Generation. Die Montage des Bioreaktors erfolgt in mehreren Schritten unter sterilen Bedingungen.

5.5 Bioreaktor-Sterilität

Nach Gassterilisation der Reaktor-Komponenten, die mit Zellen und/oder Zellkulturmedium in Kontakt kommen, ergab die mikrobiologische Untersuchung von Medienproben nach 24 und 96 stündigen Betrieb des Bioreaktors weder aerobes noch anaerobes (Hefen) Wachstum. Zugehörige Befunde des Max-von-Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität München sind dem Anhang F zu entnehmen. Damit ist die dynamische Untersuchung von besiedelten Zellträgern unter sterilen Bedingungen möglich.

5.6 Bioreaktor-Funktionalität

Die Funktionalität des Bioreaktors wurde zum Einen makroskopisch durch die Kontrolle einer pulsierenden Meniskusbewegung in den Medienkompartimenten überprüft. Zum Anderen erfolgte eine sensorische Druckmessung im Druckkompartiment zur Ermittlung der Druckamplitude.

Die makroskopische Überprüfung der Medienkompartimente mit einem Füllvolumen von 2 ml zeigte bei maximaler Drehzahl des Getriebemotors eine pulsierende Meniskusbewegung. Zudem ergab die Druckmessung im Druckkompartiment eine gleichmäßig oszillierende Sinuswelle von 19 mmHg (siehe Abbildung 5.21).

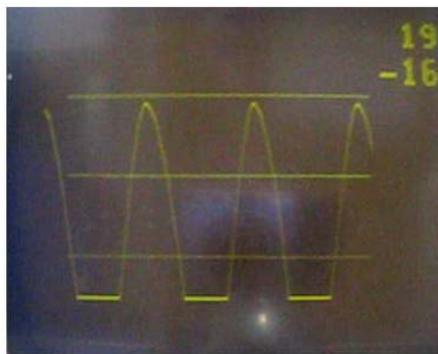


Abbildung 5.21. Druckmessung im Druckkompartiment des Bioreaktors der 3. Generation. Die Messung des Druckes ergab bei einer Pulsfrequenz von 65 bpm eine gleichmäßig oszillierende Sinuswelle von 19 mmHg.

5.7 Mechanische Belastbarkeit besiedelter Zellträger

5.7.1 Anwachsrate nach dynamischer Beanspruchung

Um die mechanische Belastbarkeit von UCMSC auf titanisierten CVP zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 7×10^2 , 4×10^2 bzw. 3×10^2 UCMSC/mm² ausgesät (siehe 4.4.6). Nach Inkubation von 1-5 d wurden die besiedelten Zellträger im Bioreaktor der 3. Generation bei einer Frequenz von 65 bpm für 24 h mechanisch belastet. Anschließend wurden die adhärenen UCMSC wie unter 4.6.4 beschrieben, fluoreszenzmarkiert und quantifiziert. Dazu wurde der prozentuale Anteil adhärenen UCMSC bestimmt und auf den Prozentsatz von UCMSC, die auf titanisierten CVP adhärten aber keiner mechanischen Belastung ausgesetzt wurden, normiert. In orientierenden Versuchen konnte bei einer Aussatzzellzahl (AZ) von 7×10^2 UCMSC/mm² und einer Inkubation von 1 d nach mechanischer Belastung keine adhärenen UCMSC nachgewiesen werden. In Abbildung 5.22 sind die Anwachsrate nach einer Inkubation von 2-5 d bei unterschiedlichen AZ dargestellt.

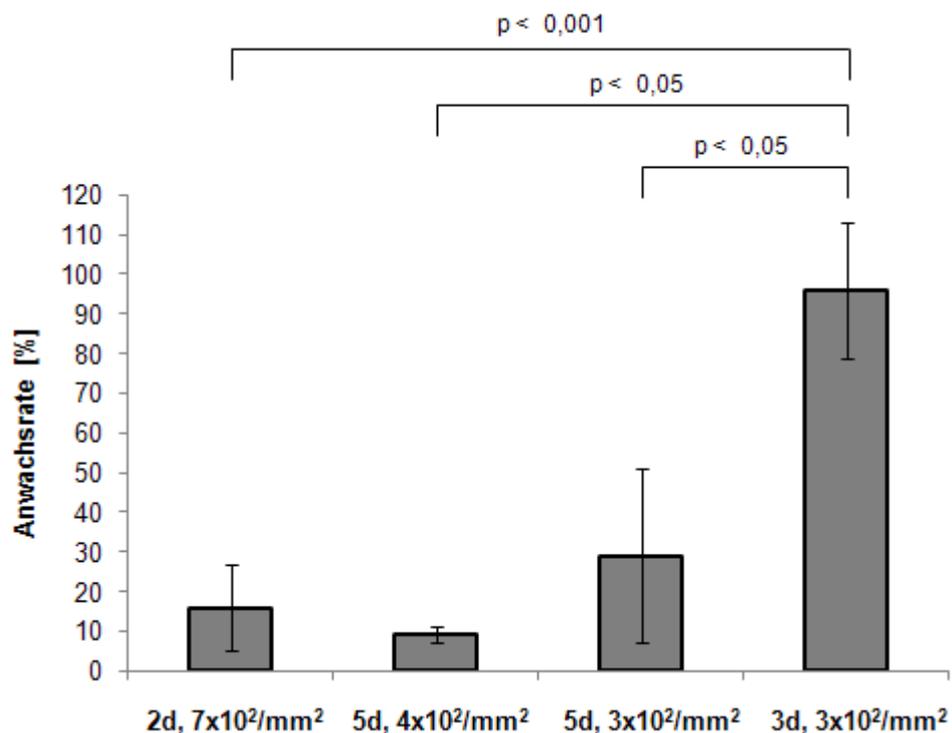


Abbildung 5.22. Anwachsrate von UCMSC auf titanisierten CVP nach mechanischer Belastung im Bioreaktor der 3. Generation. Die signifikant höchste Anwachsrate zeigte sich nach 3 d Inkubation bei einer AZ von 3×10^2 UCMSC/mm² ($p < 0,001$). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von Triplikaten aus vier unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, ist die Anwachsrate auf titanisierten CVP nach 3 d Inkubation bei einer AZ von 3×10^2 UCMSC/mm² signifikant am höchsten. Nach 2 d Inkubation und einer AZ von 7×10^2 UCMSC/mm² verbleibt nach mechanischer Belastung ein vergleichsweise niedriger Prozentsatz von 16 % adhärenter UCMSC auf dem Zellträger. Bei Inkubation von 5 d und einer AZ von 4×10^2 bzw. 3×10^2 UCMSC/mm² zeigten sich Anwachsrate von 9 % bzw. 29 %. Wie die in Abbildung 5.23 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen (A) und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (B) von UCMSC auf titanisierten CVP ohne mechanischer Belastung zeigen, ist dies vermutlich auf eine beginnende Ablösung des Zellrasens durch Überschreiten der Konfluenz zurückzuführen.

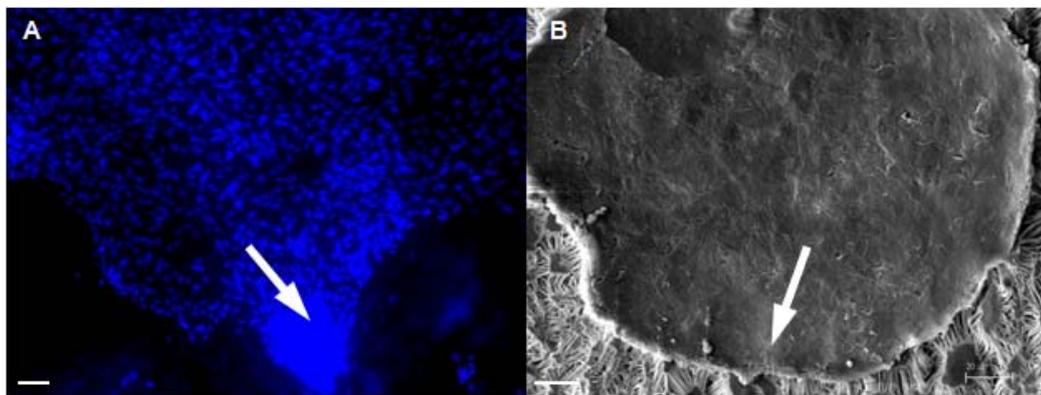


Abbildung 5.23. Ablösung des Zellrasens von Zellträgern ohne mechanische Belastung nach 5 d Inkubation bei einer AZ von 4×10^2 bzw. 3×10^2 UCMSC/mm². Fluoreszenzaufnahmen (A, Zellkernfärbung mittels DAPI) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (B) von UCMSC auf titanisierten CVP zeigen eine beginnende Ablösung des Zellrasens durch Überschreiten der Konfluenz (Pfeile). Die Aufnahmen sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente in Triplikaten. Maßstabsbalken: A = 100 μ m (Vergrößerung 100 x), B = 20 μ m (Vergrößerung 1000 x).

5.7.2 Morphologie nach dynamischer Beanspruchung

Die Besiedelung des titanisierten CVP wurde wie unter 4.4.6 beschrieben durchgeführt. Die Morphologie der UCMSC wurde nach mechanischer Belastung im Bioreaktor der 3. Generation (siehe 5.4.3), rasterelektronenmikroskopisch (siehe 4.6.7) untersucht. Abbildung 5.24 zeigt UCMSC mit einer AZ von 3×10^2 UCMSC/mm² und 3 d Inkubation nach mechanischer Belastung (A, C) sowie ohne mechanische Belastung (B, D). Mechanisch beanspruchte UCMSC (A) weisen im Vergleich zu UCMSC ohne mechanische Belastung (B) eine ähnliche Konfluenz auf. Bei näherer Betrachtung der Zelloberfläche von mechanischen beanspruchten UCMSC (C) und UCMSC ohne mechanische Belastung (D) ist kein gravierender Unterschied erkennbar.

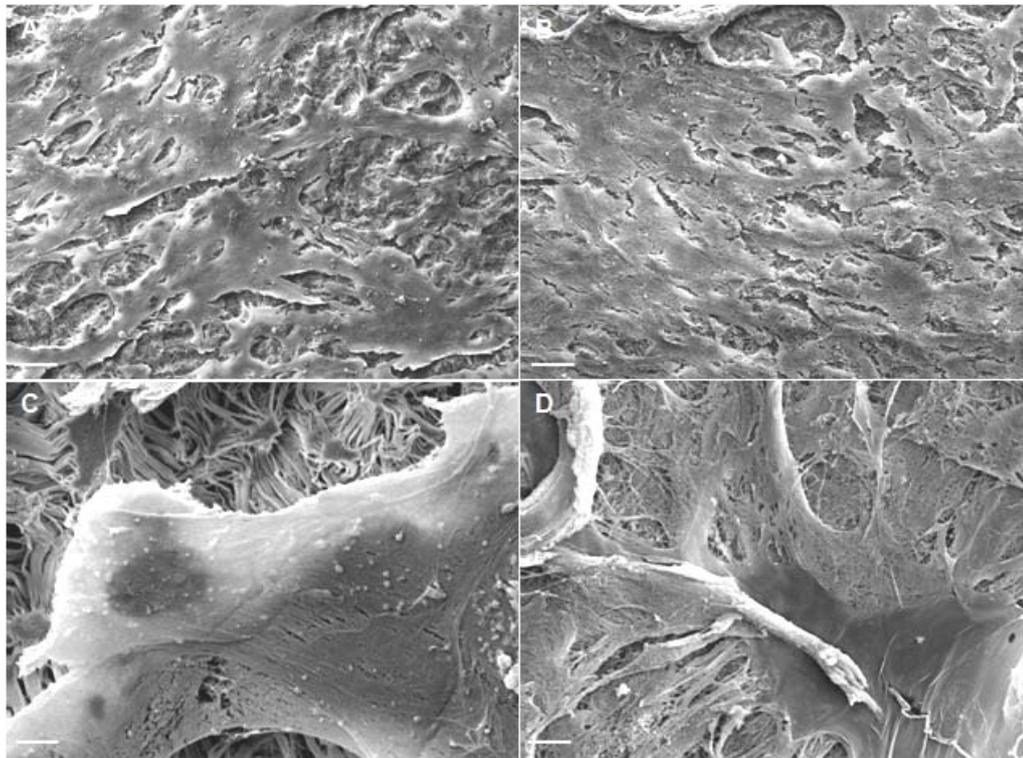


Abbildung 5.24. REM-Aufnahmen von mechanisch beanspruchten UCMSC und UCMSC ohne mechanischer Belastung. Mechanisch beanspruchte UCMSC (A) zeigen eine vergleichbare Konfluenz wie UCMSC ohne Beanspruchung (B). Die Zelloberfläche mechanisch beanspruchter UCMSC (C) weist im Vergleich zu UCMSC ohne mechanische Belastung keinen Unterschied auf. Die Aufnahmen sind repräsentativ für Triplikate aus einem Experiment. Maßstabsbalken: A, B = 100 μm (Vergrößerung 500 x), C, D = 5 μm (Vergrößerung 2000 x).

6 Diskussion & Synopsis

6.1 Besiedelung von Zellträgern *in vitro*

Die Geweberekonstruktion nach einem Infarkt durch Zellen, die die Funktion des Herzens unterstützen und/oder trophische Faktoren für residuelle Gewebestammzellen sekretieren, stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Wiederherstellung des Herzmuskels dar [115]. Das Potential mesenchymaler Stammzellen (MSC) als kardiales Therapeutikum wurde bereits vielfach untersucht; MSC zeigten dabei ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential [154]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte in Übereinstimmung mit mehreren Publikationen gezeigt werden, dass MSC aus dem Nabelschnurgewebe (UCMSC) vielversprechende Kandidaten für das kardiale Tissue Engineering sind [37,86,136,139]. Gezüchtete kardiale Implantate, bestehend aus MSC und Zellträgern wurden bereits zur Behebung von Herzmuskel-Defekten verwendet. Jedoch ist diese Art des Gewebeersatzes zur Wiederherstellung des Herzmuskels durch verfügbare Zellträger-Materialien limitiert [50,100]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, bereits klinisch zugelassenen Implantate Dualmesh® und Cardiovascular Patch bestehen aus expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE). Gefäßprothesen aus ePTFE sind im vaskulären Tissue Engineering weit verbreitet, wobei deren Verwendung durch die unzureichende Anlagerung von vaskulären Zellen auf diesen synthetischen Implantaten stark eingeschränkt ist [50,134]. Yu et al. berichteten, dass Endothelzellen im Gegensatz zu glatten Muskelzellen kaum auf unbeschichteten ePTFE adhären [153]. Die hier vorgestellten Untersuchungen zur Anwachsrate, Vitalität, Proliferation und Morphologie der UCMSC auf unbeschichteten ePTFE Zellträgern zeigten ungenügende Resultate auch für UCMSC. Dies stimmt mit Ergebnissen von Neuss et al. überein [91]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass MSC aus dem Knochenmark (BMMSC) eine untypische kugelförmige Gestalt auf ePTFE aufweisen. Zudem unterbindet ePTFE die Proliferation von BMMSC, was dafür spricht, dass Zellen eine Matrix benötigen, die ausreichend Bindungsstellen zur Verfügung stellt. Für die *in vitro* Endothelialisierung von vaskulären ePTFE-Implantaten, ist ein Klebstoff aus klinisch zugelassenem Fibrin beschrieben [84]. Allerdings ist häufig die Unversehrtheit von Beschichtungen mit Adhäsionsproteinen wie Fibrin nach mechanischer Beanspruchung nicht mehr gegeben. Um vorgenannte Problematik biologischer Beschichtungen zu umgehen, wurden in dieser Arbeit ePTFE-Zellträger mit Titan beschichtet. Titan und Titanlegierungen sind aufgrund der Kombination von mechanischer Belastbarkeit, Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität als medizinische Implantatwerkstoffe weit verbreitet [144]. Neben bereits veröffentlichten Untersuchungen von knochenmarkstämmigen MSC auf Titan [76,123] geht aus dieser Arbeit hervor, dass titanisierte ePTFE-Zellträger bezüglich der Anwachsrate, Vitalität und Proliferation von UCMSC, unbeschichteten ePTFE-Zellträgern überlegen sind [53]. Unabhängig davon, aus welchem biokompatiblen Material Zellträger bestehen,

beeinflusst die Mikroarchitektur beispielsweise die Porosität, Porengeometrie und Oberflächentextur des Zellträgers entscheidend die Zellfunktion [82]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig titanisiertes Dualmesh® (DM) und titanisiertes Cardiovascular Patch (CVP), die sich in der Oberflächentopographie unterscheiden, zur Besiedelung mit UCMSC verglichen. Unbeschichtetes DM wurde bereits bei tausenden von Leistenbruchoperationen verwendet [109]. CVP wurde in zahlreichen Studien zur Endarteriektomie [98] und zu Septumsdefekten [1] angewandt. In der vorliegenden Arbeit zeigten UCMSC auf titanisierten CVP eine signifikant höhere Anwachsrate und Proliferation als auf titanisierten DM. Dies deutet darauf hin, dass die homogene mikroporöse Struktur von CVP gegenüber der gerippten Textur der DM-Oberfläche von Vorteil ist. Es bleibt allerdings noch zu untersuchen, ob dies auch auf die Porengröße des DM zurückzuführen ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zellbesiedelung von titanisierten ePTFE eine effiziente Strategie darstellt, um eine zelluläre Beschichtung kardialer Implantate mit UCMSC zu erzielen.

6.2 Bioreaktor – Simulation des pulsierenden Herzens

Es ist bekannt, dass Bioreaktoren die Entstehung von *in vitro* generierten Herzmuskelgewebe fördern [4,39,44]. Die dynamische Umgebung stimuliert dabei die Formation einer extrazellulären Matrix woraus adäquate biochemische und biomechanische Eigenschaften des Konstruktes resultieren [116]. Im Hinblick auf die Verwendung von besiedelten Zellträgern zur Regeneration der ischämischen Region nach einem Myokardinfarkt, wurde zur Untersuchung der Stabilität der zellulären Beschichtung sowie der zellulären Differenzierung unter mechanischer Belastung im Rahmen dieser Dissertation ein neuartiger pulsatile Bioreaktor entwickelt. Im theoretischen Entwurf des Bioreaktors der 1. Generation war vorgesehen, die auf der Pulsmembran befestigten Zellträger durch die pulsatile Wölbung der Pulsmembran mechanisch zu belasten. Die Nährstoffversorgung der besiedelten Zellträger soll durch Zellkulturmedium im Medienkompartiment gewährleistet werden. Durch den Luer-Lock-Anschluss am Medienkompartiment soll die Befüllung mit frischem Kulturmedium ermöglicht werden. Nachteilig erscheint allerdings bei dieser Konstruktion die Zellträgerbefestigung durch Pins. Durch diese Fixierung der Zellträger ist steriles Arbeiten vermutlich erschwert sowie die Befestigungsstabilität fraglich. Die Entnahme von verbrauchtem Kulturmedium über einen einzelnen Luer-Lock-Anschluss am Medienkompartiment erscheint zudem unvorteilhaft. Durch die Verwendung von nur einer pulsierenden Membran treten bei paralleler Untersuchung mehrerer besiedelter Zellträger darüber hinaus unterschiedliche undefinierte Belastungen auf. Die geplante Verwendung von drei Pulsmembranen in der Konzeption des Bioreaktors der 2. Generation soll dagegen eine definierte mechanische Belastung von drei besiedelten Zellträgern im Parallelbetrieb ermöglichen. Durch die Fixierung der Zellträger in Clipsystemen wäre zudem neben einer vereinfachten Handhabung, von einer zuverlässigen Befestigung und erleichterten sterilen Arbeiten auszugehen. Durch ein einzelnes Medienkompartiment wäre allerdings weder ein direkter Medienvergleich

noch eine makroskopische Pulsüberprüfung der einzelnen Pulsmembranen im Medienkompartiment möglich. Die 3. Generation des Bioreaktors ermöglicht durch drei separate Medienkompartimente, Vergleiche unterschiedlicher Medien, Zellen und Zellträgermaterialien unter identischer Belastung. Durch die Fertigung der Kerneinheit des Bioreaktors aus Plexiglas ist zudem eine makroskopische Pulsprüfung durch sichtbare Menisken in den Medienkompartimenten gewährleistet. Bauteile aus Plexiglas, wie auch alle weiteren Bauteile aus rostfreiem Stahl, Teflon® und Silikon sind weitestgehend unempfindlich und gassterilisierbar. Durch die Befestigung der Zellträger über Clipsysteme wird steriles Arbeiten erleichtert und neben einer einfachen Handhabung, eine zuverlässige Befestigung erreicht. Der Getriebemotor mit regulierbarer Drehzahl ermöglicht den Betrieb des Bioreaktors in einem Frequenzbereich von 1-65 bpm. Dadurch kann eine graduell ansteigende Belastung bis hin zu einer abrupten, maximalen mechanische Belastung der besiedelten Zellträger erfolgen. Darüber hinaus lässt sich der Bioreaktor der 3. Generation durch das kompakte Design in einem konventionellen Inkubator betreiben, wodurch die Temperatur- und CO₂-Versorgung gewährleistet ist. Durch den vollständig funktionstüchtigen Bioreaktor lassen sich besiedelte Zellträger unter physiologischen Bedingungen mechanisch belasten. Orientierende Untersuchungen der Anwachsrate von UCMSC auf titanisiertem CVP zeigten nach mechanischer Beanspruchung eine Abhängigkeit der Beständigkeit der zellulären Beschichtung von der Inkubationszeit vor mechanischer Belastung und der Zahl der ausgesäten Zellen. Bei Inkubation der besiedelten Zellträger von 1 d und einer AZ von 7×10^2 UCMSC/mm² konnten nach mechanischer Belastung keine adhärennten UCMSC nachgewiesen werden. Dabei ist davon auszugehen, dass der Zellverlust auf eine mangelnde Adhäsion innerhalb von 24 h und damit einem hohen Abrieb der UCMSC beruht. Eine Steigerung der Inkubationszeit von 2 d auf 5 d bei gleichzeitiger Verringerung der AZ führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Anwachsrate. Wie mikroskopische Aufnahmen belegen, ist dies auf das Ablösen des Zellrasens durch Überschreiten der Konfluenz zurückzuführen. Eine Inkubationszeit von 3 d bei einer AZ von 3×10^2 UCMSC/mm² führte dagegen zu der signifikant höchsten Anwachsrate, was auf eine geeignete Adhäsionszeit und Zelldichte zur mechanischen Belastung hindeutet. Der Wert entspricht nahezu der Anwachsrate von UCMSC auf titanisierten CVP ohne mechanische Beanspruchung. Durch die makroskopische Kontrolle der Meniskenbewegung im Medienkompartiment des Bioreaktors, kann aber eine fehlende mechanische Beanspruchung ausgeschlossen werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelloberfläche zeigen keinen Unterschied zwischen UCMSC nach mechanischer Belastung und UCMSC ohne mechanische Belastung. Inwieweit die mechanische Belastung Einfluss auf die Vitalität, Proliferation und Differenzierung der UCMSC nimmt, ist in weiteren Untersuchungen zu analysieren.

6.3 Kardiomyogene Differenzierung von UCMSC

Trotz der Fortschritte in der Behandlung von Herzinfarkten versagen derzeitige pharmazeutische und interdisziplinäre Maßnahmen bei der Regeneration von geschädigtem Herzmuskelgewebe [27]. Zwar liegen gewebständige kardiale Vorläuferzellen im menschlichen Herzen vor, und es existieren Hinweise zur Proliferation von Muskelzellen im menschlichen Herzen, jedoch ist diese Proliferation allein nicht ausreichend um den Verlust von bis zu einer Milliarde Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt zu kompensieren [31]. Durch die hohe Proliferationskapazität, Plastizität und das Migrationspotential (*Homing*) von MSC ist der Transfer von MSC zur ischämischen Region des Herzens ein vielversprechender Ansatz um die Funktion des linken Ventrikels nach einem Myokardinfarkt zu verbessern [95]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit morphologischen und immunzytochemischen Methoden gezeigt werden, dass UCMSC für das kardiale Tissue Engineering geeignet sind. In Hinblick auf zukünftige klinische Studien konnten UCMSC erfolgreich unter GMP-Bedingungen unter Erhalt ihres Phänotypes und ihrer Funktionalität kultiviert werden [51]. Zudem konnte gezeigt werden, dass klinisch geprüfte kardiovaskuläre Patche nach Titanisierung mit UCMSC besiedelbar sind und daher ein potentiell Cell-Delivery-System zur Reparatur von geschädigtem Myokard darstellt [53]. Um die Eingliederung von UCMSC in das Infarktgewebe zu verbessern, scheint eine Differenzierung von UCMSC in Richtung Kardiomyozyten vor Transplantation und damit die Vermeidung einer Maldifferenzierung *in vivo* notwendig. Die kardiomyogene Differenzierung von UCMSC (cUCMSC) durch das demethylierende Agens 5-Azazytidin wird dabei kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Martin-Rendon berichtet, dass mittels 5-Azazytidin aus UCMSC und MSC aus dem Knochenmark (BMMSC), Kardiomyozyten in nicht ausreichendem Umfang generiert werden [79]. Antonitsis et al. und Pereira et al. zeigten dagegen, dass adulte BMMSC [7] und UCMSC [95] nach 5-Azazytidin-Behandlung durchaus in Richtung Kardiomyozyten differenzieren können. Diese Unstimmigkeiten sind möglicherweise durch variierende Kulturbedingungen [22] und der uneinheitlichen Spezifizierung von Kardiomyozyten, zu erklären. Xu et al. postulieren die Verwendung von bFGF für den Differenzierungsprozess, da dieser Wachstumsfaktor für die Entwicklung muskulärer Röhrenstrukturen verantwortlich sein kann [149]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings, dass UCMSC nach 5-Azazytidin-Behandlung sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von bFGF, kardiale Marker exprimieren. cUCMSC, die nach dem Protokoll von Wu et al. generiert wurden, zeigten nach 5-Azazytidin-Behandlung (5 μ M, 24 h) neben einer Größenzunahme ein streifenförmiges Muster und exprimierten kardiiales Aktin, kardiiales Aktinin, sarkomerisches Aktin, sarkomerisches Aktinin, Myosin Heavy Chain und Connexin 43. cUCMSC behandelt mit 3 μ M 5-Azazytidin für 24 h gemäß Wang et al. und cUCMSC behandelt mit 10 μ M 5-Azazytidin für 72 h gemäß Matsuura Protokoll I zeigten ebenfalls eine morphologische Änderung und exprimierten vorgenannte kardiale

Proteine zur Regulation der Kontraktion sowie der elektrischen Zellkopplung ohne zugesetztes bFGF. TGF- β 1 in Kombination mit 5-Azazytidin wurde zur Differenzierung von humanen Kardiomyozyten-Vorläuferzellen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation von UCMSC mit TGF- β 1 und 5-Azazytidin zu einem flächigen Erscheinungsbild der cUCMSC und der Expression von kardialen Aktin, kardialen Aktinin, sarkomerischen Aktin, sarkomerischen Aktinin sowie Connexin 43, jedoch wurden die zur Kontraktion notwendigen Troponine und Myosine nicht exprimiert. Des Weiteren verringerte sich die Zellzahl während des 5-wöchigen Differenzierungsprozesses auf ein Maß, welches für immunzytochemische Analysen nicht ausreichend war. Maltsev et al. zeigten die Expression kardialer Gene, Proteine und Aktionspotentiale bei Zellen die aus murinen embryonalen Stammzellen durch die Kultivierung in hängenden Tropfen in sogenannten „embryoid bodies“ differenziert wurden. UCMSC formten unter Verwendung dieses Differenzierungssystems zwar Aggregate, allerdings war die Zahl an ausgewachsenen Zellen zur Durchführung umfangreicher immunzytochemischer Untersuchungen zu gering. Dies lässt sich möglicherweise durch die Abhängigkeit dieser Methode von der initialen Zellzahl in den Aggregaten erklären. Eine weitere Vorgehensweise der kardiomyogenen Differenzierung ist die Behandlung von Zellen mit Oxytocin. Dieses weibliche Hormon ist für die Kontraktion der Gebärmutter während des Eisprungs und der Entbindung notwendig. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Expression von Oxytocin in entwickelnden Herzen höher ist als in adulten Herzen, was wiederum auf die Beteiligung von Oxytocin bei der kardiomyogenen Differenzierung hindeutet [40]. Daten von Matsuura et al. zeigen, dass Oxytocin bei der kardiomyogenen Differenzierung von adulten murinen Sca-1+ Herzzellen wirksamer ist als 5-Azazytidin. Dies stimmt mit Ergebnissen dieser Arbeit überein, die zeigen dass humane UCMSC nach Behandlung mit 10 nm Oxytocin über 72 h häufiger die Kardiomyozyten-assoziierten Proteine kardiales Aktin, kardiales Aktinin, sarkomerisches Aktin, sarkomerisches Aktinin, Myosin Heavy Chain, Connexin 43 und kardiales Troponin T exprimieren als nach Behandlung mit 10 μ M 5 Azazytidin über 72 h. Zusammenfassend zeigten die immunzytochemischen Untersuchungen die Differenzierbarkeit von UCMSC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen durch Oxytocin als effizienteres Differenzierungssagens. Derzeit sind funktionelle Analysen wie die Aufzeichnung von Aktionspotentialen mittels Patch-Clamp-Technik und die Messung des intrazellulären Kalziumflusses bei Oxytocin-differenzierten cUCMSC in Bearbeitung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit in umfangreichen *in vitro* Untersuchungen, UCMSC erfolgreich isoliert, kultiviert, differenziert und charakterisiert wurden. Im nächsten Schritt wurden das klinisch geprüfte DM und CVP aus ePTFE unterschiedlicher Struktur, sowohl unbeschichtet als auch titanisiert, mit UCMSC besiedelt und deren Einfluss auf die Stammzellen untersucht. Titanisiertes CVP hat sich dabei aufgrund seiner hervorragenden Biokompatibilität und seiner mikroporösen Struktur zur Besiedelung bewährt, wodurch die *in-vitro* Methodik für das kardiale Tissue Engineering etabliert und validiert ist.

7 Ausblick

Um die klinische Relevanz der hier vorgestellten Technik für die regenerative Medizin beurteilen zu können, sind präklinische (*in vivo*) Untersuchungen erforderlich. Im Rahmen einer bereits genehmigten präklinischen Studie ist die Eignung, Sicherheit und Effizienz von UCMSC-besiedelten titanisierten CVP für das kardiale Tissue Engineering beim akuten Myokardinfarkt zu untersuchen. Zielsetzung der geplanten Studie ist die Untersuchung der funktionellen Wiederherstellung von Herzmuskelgewebe nach einem Myokardinfarkt durch die Implantation dieser *in vitro* generierten Gewebekonstrukte in einem klinikrelevanten Krankheitsmodell. Die Regeneration des geschädigten Myokards soll dabei durch die Integration der UCMSC in das Infarktareal und darüber hinaus durch die Stimulation und Interaktion mit residualen kardialen Vorläuferzellen erfolgen. Es wird nachzuweisen sein, dass die implantierten Konstrukte überleben, gewebespezifisch differenzieren, vaskularisiert und innerviert werden. Darüber hinaus wäre zu klären, ob das Ersatzgewebe elektrisch integriert und somit funktionell zur Rekonstruktion von defektem Myokard beiträgt. Dafür soll ein Myokardinfarkt im Rattenmodell durch Ligation des Hauptstammes der linken Herzkranzarterie induziert und der besiedelte Zellträger in der ischämischen Region des Herzmuskels implantiert werden. Anhand echokardiographischer und hämodynamischer Untersuchungen soll nach einer Beobachtungszeit von 28 Tagen die Funktionen des ischämisch geschädigten Myokards beurteilt werden.

Abkürzungsverzeichnis

Nomenklatur	
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>Angiotensin converting enzyme</i>)
AM	Acetomethoxyderivat
APC	Allophycocyanin
AZ	Aussatzzellzahl
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BMMSC	Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (<i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
bpm	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
cA	Kardiales Aktin (<i>cardiac actin</i>)
CAD	Computer-gestütztes Design (<i>Computer-aided design</i>)
cAn	Kardiales Aktinin (<i>cardiac actinin</i>)
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
cTnC	Kardiales Troponin C (<i>cardiac troponin C</i>)
cTnI	Kardiales Troponin I (<i>cardiac troponin I</i>)
cTnT	Kardiales Troponin T (<i>cardiac troponin T</i>)
cUCMSC	Kardiomyogen differenzierte mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur (<i>cardiac differentiated umbilical cord mesenchymal stem cells</i>)
CVP	Kardiovaskuläres Patch (<i>Cardiovascular patch</i>)
Cx43	Connexin 43
d	Durchmesser
d _a	Außendurchmesser
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
dest.	destilliert
d _h	Hubkolbendurchmesser
d _i	Innendurchmesser

DM	Dualmesh®
DMEM hg	Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glukose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
d _z	Zylinderdurchmesser
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ePTFE	Expandiertes Polytetrafluorethylen
EthD	Ethidiumhomodimer
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluorescein isothiocyanat
F _v	Verdünnungsfaktor
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing practice</i>)
H ₂ O	Wasser
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen-DR
HLHS	Hypoplastisches Linksherzsyndrom
hS	Humanserum
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MSC	Mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stem cells</i>)
MYH	<i>Myosin Heavy Chain</i>
n	Stichprobenumfang
n.V.	Nicht verfügbar
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)

OD	Optische Dichte
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
PACVD	Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung (<i>plasma activated chemical vapour deposition</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDGF	Thrombozyten Wachstumsfaktor (<i>platelet derived growth factor</i>)
PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyglycolsäure (<i>polyglycolacid</i>)
pH	Potentia Hydrogenii
piPSC	Protein-induzierte pluripotente Stammzellen (<i>protein-induced pluripotent stem cells</i>)
PLA	Polylactidsäure (<i>polylactidacid</i>)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTCA	Perkutane transluminare Koronarangiographie (<i>percutane transluminal coronar angiography</i>)
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sA	Sarkomerisches Aktin
sAn	Sarkomerisches Aktinin
sM	<i>Slow Myosin</i>
TC-PS	Zellkulturbehandeltes Polystyren (<i>tissue-culture polystyrene</i>)
TGF-β1	Transformierender Wachstumsfaktor-β1 (<i>Transforming growth factor-β1</i>)
TMT	Tetracisdimethylamidotitan
U	Einheiten (<i>Units</i>)
UCMSC	Mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur (<i>umbilical cord mesenchymal stem cells</i>)
V	Volumen
V _h	Hubvolumen
vWF	Von Willebrand Faktor
WST-1	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz (<i>watersoluble tetrazolium salt</i>)

Z	Lebendzellzahl
Z ₄	Summe vitaler Zellen von 4 Großquadranten

SI-Einheiten	
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
cm	Zentimeter (<i>centimetre</i>)
cm ²	Quadratcentimeter
h	Stunden (<i>hours</i>)
mg	Milligramm
min	Minuten (<i>minutes</i>)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MPa	Megapascal
nM	Nanomol

Literaturverzeichnis

- [1] AbuRahma, A.F., Hannay, R.S., Khan, J.H. et al., *Prospective randomized study of carotid endarterectomy with polytetrafluoroethylene versus collagen-impregnated Dacron (Hemashield) patching: perioperative (30-day) results*. J Vasc Surg, 35 (1), 2002, S. 125-130
- [2] Ahsan, T. and Nerem, R.M., *Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry*. Orthod Craniofac Res, 8 (3), 2005, S. 134-140
- [3] Aigner, J., Eblenkamp, M., and Wintermantel, E., *Techniques for functional tissue and organ replacement using postnatal stem cells*. Chirurg, 76 (5), 2005, S. 435-444
- [4] Akins, R.E., Boyce, R.A., Madonna, M.L. et al., *Cardiac organogenesis in vitro: reestablishment of three-dimensional tissue architecture by dissociated neonatal rat ventricular cells*. Tissue Eng, 5 (2), 1999, S. 103-118
- [5] Ali, M.J. and Davidoff, R., *Surgical, medical, and percutaneous therapies for patients with multivessel coronary artery disease*. Curr Cardiol Rep, 8 (4), 2006, S. 247-254
- [6] Alison, M.R., Poulosom, R., Forbes, S. et al., *An introduction to stem cells*. J Pathol, 197 (4), 2002, S. 419-423
- [7] Antonitsis, P., Ioannidou-Papagiannaki, E., Kaidoglou, A. et al., *In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 6 (5), 2007, S. 593-597
- [8] Atala, A., *Engineering organs*. Curr Opin Biotechnol, 20 (5), 2009, S. 575-592
- [9] Baksh, D. and Davies, J.E., *Culture of mesenchymal stem/progenitor cells in adhesion-independent conditions*. Methods Cell Biol, 86, 2008, S. 279-293
- [10] Barron, V., Lyons, E., Stenson-Cox, C. et al., *Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review*. Ann Biomed Eng, 31 (9), 2003, S. 1017-1030
- [11] Bayer, K. and Jungbauer, A., *Advances in biochemical engineering science*. J Biotechnol, 132 (2), 31-10-2007, S. 97-98
- [12] Benninghoff A. and Drenckhahn D., *Anatomie*, 16 ed, Elsevier Verlag, München, 2004, S. 41-57
- [13] Bilodeau, K. and Mantovani, D., *Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review*. Tissue Eng, 12 (8), 2006, S. 2367-2383
- [14] Blocklet, D., Toungouz, M., Berkenboom, G. et al., *Myocardial homing of nonmobilized peripheral-blood CD34+ cells after intracoronary injection*. Stem Cells, 24 (2), 2006, S. 333-336
- [15] Böcker W., Denk H., Heitz U., *Pathologie*, Elsevier Verlag, München, 2011, S. 452-453

- [16] Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D. et al., *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes*. Circ Res, 91 (3), 9-8-2002, S. 189-201
- [17] Borschel, G.H., Huang, Y.C., Calve, S. et al., *Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts*. Tissue Eng, 11 (5-6), 2005, S. 778-786
- [18] Bowlin, G.L. and Rittgers, S.E., *Electrostatic endothelial cell seeding technique for small-diameter (<6 mm) vascular prostheses: feasibility testing*. Cell Transplant, 6 (6), 1997, S. 623-629
- [19] Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W. et al., *Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts*. Blood, 110 (4), 15-8-2007, S. 1362-1369
- [20] Breme, F., *Beschichtung von Kunststoffen mit titan- und tantalhaltigen Materialien durch plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung*. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 1999
- [21] Brown, M.A., Iyer, R.K., and Radisic, M., *Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. Biotechnol Prog, 24 (4), 2008, S. 907-920
- [22] Burlacu, A., *Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview*. Arch Physiol Biochem, 112 (4-5), 2006, S. 260-264
- [23] Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M. et al., *Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells*. Gastroenterology, 134 (3), 2008, S. 833-848
- [24] Caplan, A.I. and Dennis, J.E., *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 98 (5), 1-8-2006, S. 1076-1084
- [25] Carnagey, J., Hern-Anderson, D., Ranieri, J. et al., *Rapid endothelialization of PhotoFix natural biomaterial vascular grafts*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 65 (1), 15-4-2003, S. 171-179
- [26] Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M. et al., *Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA*. Genes Dev, 15 (20), 15-10-2001, S. 2702-2719
- [27] Charwat, S., Gyongyosi, M., Lang, I. et al., *Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art*. Exp Hematol, 36 (6), 2008, S. 672-680
- [28] Chen, H.C. and Hu, Y.C., *Bioreactors for tissue engineering*. Biotechnol Lett, 28 (18), 2006, S. 1415-1423
- [29] Chen, M.Y., Lie, P.C., Li, Z.L. et al., *Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 37 (5), 2009, S. 629-640
- [30] Christman, K.L. and Lee, R.J., *Biomaterials for the treatment of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 48 (5), 5-9-2006, S. 907-913
- [31] Collins, S.D., Baffour, R., and Waksman, R., *Cell therapy in myocardial infarction*. Cardiovasc Revasc Med, 8 (1), 2007, S. 43-51

- [32] Connor, J.A. and Thiagarajan, R., *Hypoplastic left heart syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2007, S. 23
- [33] Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K. et al., *Biomaterials for stem cell differentiation*. Adv Drug Deliv Rev, 60 (2), 14-1-2008, S. 215-228
- [34] Dewey, M., Borges, A.C., Kivelitz, D. et al., *Coronary artery disease: new insights and their implications for radiology*. Eur Radiol, 14 (6), 2004, S. 1048-1054
- [35] Dieterich H.A. and Mörl H., *Koronare Herzkrankheit*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1993, S. 37-44
- [36] Dumont, K., Yperman, J., Verbeken, E. et al., *Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation*. Artif Organs, 26 (8), 2002, S. 710-714
- [37] Eblenkamp, M., Aigner, J., Hintermair, J. et al., *Umbilical cord stromal cells (UCSC). Cells featuring osteogenic differentiation potential*. Orthopade, 33 (12), 2004, S. 1338-1345
- [38] Engelmayr, G.C., Jr., Hildebrand, D.K., Sutherland, F.W. et al., *A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials*. Biomaterials, 24 (14), 2003, S. 2523-2532
- [39] Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U. et al., *Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system*. FASEB J, 11 (8), 1997, S. 683-694
- [40] Fathi, F., Murasawa, S., Hasegawa, S. et al., *Cardiac differentiation of P19CL6 cells by oxytocin*. Int J Cardiol, 134 (1), 1-5-2009, S. 75-81
- [41] Feng, B., Jiang, J., Kraus, P. et al., *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb*. Nat Cell Biol, 11 (2), 2009, S. 197-203
- [42] Feugier, P., Black, R.A., Hunt, J.A. et al., *Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress*. Biomaterials, 26 (13), 2005, S. 1457-1466
- [43] Fraser, J.K., Schreiber, R.E., Zuk, P.A. et al., *Adult stem cell therapy for the heart*. Int J Biochem Cell Biol, 36 (4), 2004, S. 658-666
- [44] Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G., *Microgravity tissue engineering*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 33 (5), 1997, S. 381-385
- [45] Fukuda, K., *Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering*. Artif Organs, 25 (3), 2001, S. 187-193
- [46] Garcia-Garcia, H.M., Vaina, S., Tsuchida, K. et al., *Drug-eluting stents*. Arch Cardiol Mex, 76 (3), 2006, S. 297-319
- [47] Gersh, B.J. and Rahimtoola, S.H., *Acute Myocardial Infarction*, Elsevier Verlag, New York, 1991, S. 32-47

- [48] Goldstein, A.S. and Christ, G., *Functional tissue engineering requires bioreactor strategies*. Tissue Eng Part A, 15 (4), 2009, S. 739-740
- [49] Goumans, M.J., de Boer, T.P., Smits, A.M. et al., *TGF-beta1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro*. Stem Cell Res, 1 (2), 2007, S. 138-149
- [50] Gulbins, H., Dauner, M., Petzold, R. et al., *Development of an artificial vessel lined with human vascular cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 128 (3), 2004, S. 372-377
- [51] Hartmann, I., Hollweck, T., Haffner, S. et al., *Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties*. J Immunol Methods, 363 (1), 15-12-2010, S. 80-89
- [52] Heng, B.C., Haider, H.K., Sim, E.K. et al., *Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro*. Cardiovasc Res, 62 (1), 1-4-2004, S. 34-42
- [53] Hollweck, T., Marschmann, M., Hartmann, I. et al., *Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds*. Biomed Mater, 5 (6), 6-10-2010, S. 065004
- [54] Hoppe, U.C., *Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz*. Kardiologie, 94 (8), 2005, S. 488-509
- [55] Horwitz, E.M., Ie, B.K., Dominici, M. et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 7 (5), 2005, S. 393-395
- [56] Ikada, Y., *Challenges in tissue engineering*. J R Soc Interface, 3 (10), 22-10-2006, S. 589-601
- [57] Isenberg, B.C., Williams, C., and Tranquillo, R.T., *Small-diameter artificial arteries engineered in vitro*. Circ Res, 98 (1), 6-1-2006, S. 25-35
- [58] Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D. et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers*. Mol Med, 6 (2), 2000, S. 88-95
- [59] Jackson G., *Koronare Herzkrankheit*, Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 1993, S. 13-16
- [60] Jawad, H., Ali, N.N., Lyon, A.R. et al., *Myocardial tissue engineering: a review*. J Tissue Eng Regen Med, 1 (5), 2007, S. 327-342
- [61] Jawad, H., Lyon, A.R., Harding, S.E. et al., *Myocardial tissue engineering*. Br Med Bull, 87 2008, S. 31-47
- [62] Kaehler, J., Zilla, P., Fasol, R. et al., *Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts*. J Vasc Surg, 9 (4), 1989, S. 535-541
- [63] Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Butler, P.E. et al., *Current status of prosthetic bypass grafts: a review*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 74 (1), 2005, S. 570-581

- [64] Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S. et al., *Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms*. Circulation, 109 (12), 30-3-2004, S. 1543-1549
- [65] Kocafe, C., Balci, D., Hayta, B.B. et al., *Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair*. Stem Cell Rev, 6 (4), 2010, S. 512-522
- [66] Kocher, A.A., Schlechta, B., Gasparovicova, A. et al., *Stem cells and cardiac regeneration*. Transpl Int, 20 (9), 2007, S. 731-746
- [67] Kofidis, T., Akhyari, P., Wachsmann, B. et al., *A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 22 (2), 2002, S. 238-243
- [68] Kufer V., *Zur anatomischen Verteilung von adulten kardialen Stammzellen im human Myokard*. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 2010
- [69] Kutschka, I., *Das Schicksal kardialer Zelltransplantate*. Herz-Thorax-Gefäßchirurgie, 22 (4), 2008, S. 224-232
- [70] Langer, R. and Vacanti, J.P., *Tissue engineering*. Science, 260 (5110), 14-5-1993, S. 920-926
- [71] le Blanc, K., *Lymphocyte recovery: an overlooked contribution to autologous stem cell transplant outcome*. Cytotherapy, 10 (5), 2008, S. 441-442
- [72] Levick, J.R., *An introduction to cardiovascular physiology*, 4 ed, Arnold Verlag, London, 2003
- [73] Lippert H., Herbold D., Lippert-Burmester W., *Anatomie kurz gefasst*, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2007, S. 53-60
- [74] Löffler G., Heinrich P., Petrides P., *Biochemie & Pathobiochemie*, 8 ed, Springer Verlag, Berlin, München, Heidelberg, 2010, S. 1004-1013
- [75] Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S. et al., *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 355 (12), 21-9-2006, S. 1199-1209
- [76] Maeda, M., Hirose, M., Ohgushi, H. et al., *In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds*. J Biochem, 141 (5), 2007, S. 729-736
- [77] Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J. et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 44 (1), 1993, S. 41-50
- [78] Marelli, D., Desrosiers, C., el-Alfy, M. et al., *Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach*. Cell Transplant, 1 (6), 1992, S. 383-390
- [79] Martin-Rendon, E., Sweeney, D., Lu, F. et al., *5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies*. Vox Sang, 95 (2), 2008, S. 137-148

- [80] Martin-Rendon, E. and Watt, S.M., *Exploitation of stem cell plasticity*. Transfus Med, 13 (6), 2003, S. 325-349
- [81] Mastitskaya, S. and Denecke, B., *Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes in vitro*. J Negat Results Biomed, 8 2009, S. 11
- [82] Mata, A., Kim, E.J., Boehm, C.A. et al., *A three-dimensional scaffold with precise micro-architecture and surface micro-textures*. Biomaterials, 30 (27), 2009, S. 4610-4617
- [83] Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N. et al., *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes*. J Biol Chem, 279 (12), 19-3-2004, S. 11384-11391
- [84] Meinhart, J.G., Deutsch, M., Fischlein, T. et al., *Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts*. Ann Thorac Surg, 71 (5 Suppl), 2001, S. S327-S331
- [85] Minuth, W.W. and Strehl, R., *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*, Wiley-VCH Verlag, 2003, S. 144-182
- [86] Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M. et al., *Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia*. Stem Cells, 21 (1), 2003, S. 50-60
- [87] Mol, A., Driessen, N.J., Rutten, M.C. et al., *Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach*. Ann Biomed Eng, 33 (12), 2005, S. 1778-1788
- [88] Morsi, Y.S., Yang, W.W., Owida, A. et al., *Development of a novel pulsatile bioreactor for tissue culture*. J Artif Organs, 10 (2), 2007, S. 109-114
- [89] Nakano, T., Kado, H., Ishikawa, S. et al., *Midterm surgical results of total cavopulmonary connection: clinical advantages of the extracardiac conduit method*. J Thorac Cardiovasc Surg, 127 (3), 2004, S. 730-737
- [90] Nanaev, A.K., Kohnen, G., Milovanov, A.P. et al., *Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord*. Placenta, 18 (1), 1997, S. 53-64
- [91] Neuss, S., Apel, C., Buttler, P. et al., *Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering*. Biomaterials, 29 (3), 2008, S. 302-313
- [92] Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S. et al., *Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium*. Pediatr Transplant, 7 Suppl 3 2003, S. 86-88
- [93] Paquin, J., Danalache, B.A., Jankowski, M. et al., *Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99 (14), 9-7-2002, S. 9550-9555
- [94] Perea, H., *Magnetic vascular engineering: development and validation*, Shaker Verlag, Aachen, 2008, S. 15-110
- [95] Pereira, W.C., Khushnooma, I., Madkaikar, M. et al., *Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation*. J Tissue Eng Regen Med, 2 (7), 2008, S. 394-399

- [96] Pittenger, M.F. and Martin, B.J., *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 95 (1), 9-7-2004, S. 9-20
- [97] Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T. et al., *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts*. Circulation, 100 (2), 13-7-1999, S. 193-202
- [98] Rhodes, V.J., *Expanded polytetrafluoroethylene patch angioplasty in carotid endarterectomy*. J Vasc Surg, 22 (6), 1995, S. 724-730
- [99] Roberts, W.C., Perry, L.W., Chandra, R.S. et al., *Aortic valve atresia: a new classification based on necropsy study of 73 cases*. Am J Cardiol, 37 (5), 1976, S. 753-756
- [100] Robinson, K.A., Li, J., Mathison, M. et al., *Extracellular matrix scaffold for cardiac repair*. Circulation, 112 (9 Suppl), 30-8-2005, S. I135-I143
- [101] Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., and Smirnov, V.N., *Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord*. Stem Cells, 21 (1), 2003, S. 105-110
- [102] Ross, R., *The arterial wall and atherosclerosis*. Annu Rev Med, 30 1979, S. 1-15
- [103] Ross, R., *Cell biology of atherosclerosis*. Annu Rev Physiol, 57 1995, S. 791-804
- [104] Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 138 (5 Pt 2), 1999, S. S419-S420
- [105] Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 340 (2), 14-1-1999, S. 115-126
- [106] Saito, T., Kuang, J.Q., Bittira, B. et al., *Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells*. Ann Thorac Surg, 74 (1), 2002, S. 19-24
- [107] Sano, S., Ishino, K., Kawada, M. et al., *Right ventricle-pulmonary artery shunt in first-stage palliation of hypoplastic left heart syndrome*. J Thorac Cardiovasc Surg, 126 (2), 2003, S. 504-509
- [108] Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A. et al., *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 355 (12), 21-9-2006, S. 1210-1221
- [109] Schug-Pass, C., Tamme, C., Tannapfel, A. et al., *A lightweight polypropylene mesh (TiMesh) for laparoscopic intraperitoneal repair of abdominal wall hernias: comparison of biocompatibility with the DualMesh in an experimental study using the porcine model*. Surg Endosc, 20 (3), 2006, S. 402-409
- [110] Seshareddy, K., Troyer, D., and Weiss, M.L., *Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord*. Methods Cell Biol, 86 2008, S. 101-119
- [111] Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A., *Aging of mesenchymal stem cells*. Ageing Res Rev, 5 (1), 2006, S. 91-116

- [112] Shachar, M. and Cohen, S., *Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors*. Heart Fail Rev, 8 (3), 2003, S. 271-276
- [113] Shake, J.G., Gruber, P.J., Baumgartner, W.A. et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. Ann Thorac Surg, 73 (6), 2002, S. 1919-1925
- [114] Shinoka, T. and Breuer, C., *Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery*. Yale J Biol Med, 81 (4), 2008, S. 161-166
- [115] Simpson, D., Liu, H., Fan, T.H. et al., *A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling*. Stem Cells, 25 (9), 2007, S. 2350-2357
- [116] Sodian, R., Lemke, T., Loebe, M. et al., *New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches*. J Biomed Mater Res, 58 (4), 2001, S. 401-405
- [117] Spangrude, G.J., *When is a stem cell really a stem cell?* Bone Marrow Transplant, 32 Suppl 1 2003, S. S7-11
- [118] Stahlhofen, S., *Lokalisation, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten-Mitochondrien*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2010
- [119] Stamm, C., Nasser, B., Choi, Y.H. et al., *Cell therapy for heart disease: great expectations, as yet unmet*. Heart Lung Circ, 18 (4), 2009, S. 245-256
- [120] Stamm, C. and Steinhoff, G., *Kardiales Tissue Engineering*. Herz, 27 (5), 2011, S. 445-452
- [121] Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D. et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. Lancet, 361 (9351), 4-1-2003, S. 45-46
- [122] Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr. 344 Todesursachen 2008 Deutschland. 2009
- [123] Stiehler, M., Lind, M., Mygind, T. et al., *Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces*. J Biomed Mater Res A, 86 (2), 2008, S. 448-458
- [124] Stock, U.A. and Vacanti, J.P., *Tissue engineering: current state and prospects*. Annu Rev Med, 52 2001, S. 443-451
- [125] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M. et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 131 (5), 30-11-2007, S. 861-872
- [126] Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 126 (4), 25-8-2006, S. 663-676
- [127] Taylor, D.A., Atkins, B.Z., Hungspreugs, P. et al., *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation*. Nat Med, 4 (8), 1998, S. 929-933

- [128] Thurisch, B., *Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4 durch eine Mausmutante mit einem induzierbaren RNA-Interferenz System*. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, 1979
- [129] Tittel, K., *Beschreibende und funktionelle Anatomie des Menschen*, 14 ed, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2003, S. 283-292
- [130] Tiwari, A., Salacinski, H.J., Hamilton, G. et al., *Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 21 (3), 2001, S. 193-201
- [131] Tondeur, S., Assou, S., Nadal, L. et al., *[Biology and potential of human embryonic stem cells]*. Ann Biol Clin (Paris), 66 (3), 2008, S. 241-247
- [132] Troyer, D.L. and Weiss, M.L., *Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population*. Stem Cells, 26 (3), 2008, S. 591-599
- [133] van Nieuwenhuizen, R.C., Peters, M., Lubbers, L.J. et al., *Abnormalities in liver function and coagulation profile following the Fontan procedure*. Heart, 82 (1), 1999, S. 40-46
- [134] Vara, D.S., Salacinski, H.J., Kannan, R.Y. et al., *Cardiovascular tissue engineering: state of the art*. Pathol Biol (Paris), 53 (10), 2005, S. 599-612
- [135] Vats, A., Tolley, N.S., Polak, J.M. et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 28 (3), 2003, S. 165-172
- [136] Wang, H.S., Hung, S.C., Peng, S.T. et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 22 (7), 2004, S. 1330-1337
- [137] Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K. et al., *A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 15 (8), 2009, S. 2259-2266
- [138] Wang, M., Yang, Y., Yang, D. et al., *The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro*. Immunology, 126 (2), 2009, S. 220-232
- [139] Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S. et al., *Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells*. Stem Cells, 26 (11), 2008, S. 2865-2874
- [140] Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R. et al., *Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease*. Stem Cells, 24 (3), 2006, S. 781-792
- [141] Weiss, M.L. and Troyer, D.L., *Stem cells in the umbilical cord*. Stem Cell Rev, 2 (2), 2006, S. 155-162
- [142] Wintermantel, E. and Ha, S.W., *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, 3 ed, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2002, S. 149-210
- [143] Wintermantel, E. and Ha, S.W., *Medizintechnik Life Science Engineering*, 4 ed, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2008, S. 733-740

- [144] Wittwer, G., Adeyemo, W.L., Yerit, K. et al., *Complications after zygoma fracture fixation: is there a difference between biodegradable materials and how do they compare with titanium osteosynthesis?* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 101 (4), 2006, S. 419-425
- [145] Wormer, E.J., *Stammzellen - Mehr Wissen?*, Lingen Verlag, Köln, 2003
- [146] Wu, K.H., Mo, X.M., Zhou, B. et al., *Cardiac potential of stem cells from whole human umbilical cord tissue.* J Cell Biochem, 107 (5), 1-8-2009, S. 926-932
- [147] Wu, S., Liu, X., Hu, T. et al., *A biomimetic hierarchical scaffold: natural growth of nanotitanates on three-dimensional microporous Ti-based metals.* Nano Lett, 8 (11), 2008, S. 3803-3808
- [148] Xu, C., Police, S., Rao, N. et al., *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.* Circ Res, 91 (6), 20-9-2002, S. 501-508
- [149] Xu, W., Zhang, X., Qian, H. et al., *Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro.* Exp Biol Med (Maywood), 229 (7), 2004, S. 623-631
- [150] Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.* Tissue Eng, 7 (6), 2001, S. 679-689
- [151] Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques.* Tissue Eng, 8 (1), 2002, S. 1-11
- [152] Yankelson, L., Feld, Y., Bressler-Stramer, T. et al., *Cell therapy for modification of the myocardial electrophysiological substrate.* Circulation, 117 (6), 12-2-2008, S. 720-731
- [153] Yu, H., Dai, W., Yang, Z. et al., *Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo.* J Vasc Surg, 38 (3), 2003, S. 557-563
- [154] Zhang, G., Wang, X., Wang, Z. et al., *A PEGylated fibrin patch for mesenchymal stem cell delivery.* Tissue Eng, 12 (1), 2006, S. 9-19
- [155] Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y. et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.* Cell Stem Cell, 4 (5), 8-5-2009, S. 381-384
- [156] Zimmermann, W.H., Didie, M., Doker, S. et al., *Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy.* Cardiovasc Res, 71 (3), 1-8-2006, S. 419-429
- [157] Zimmermann, W.H. and Eschenhagen, T., *Cardiac tissue engineering for replacement therapy.* Heart Fail Rev, 8 (3), 2003, S. 259-269
- [158] Zimmermann, W.H., Fink, C., Kralisch, D. et al., *Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes.* Biotechnol Bioeng, 68 (1), 5-4-2000, S. 106-114
- [159] Zimmermann, W.H., Schneiderbanger, K., Schubert, P. et al., *Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct.* Circ Res, 90 (2), 8-2-2002, S. 223-230

Veröffentlichte Teile der Dissertation

Originalarbeiten

Hollweck T., Marschmann M., Hartmann I., Akra B., Meiser B., Reichart B., Eblenkamp M., Wintermantel E. und Eissner G., Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds, *Biomed. Mater.*, 5: 065004

Hollweck T., Hartmann I., Eblenkamp M., Wintermantel E., Reichart B., Überfuhr P. and Eissner G., Cardiac differentiation of Wharton's jelly stem cells – experimental comparison of protocols, *Open Tissue Eng. Regen. Med. J*, Manuskript eingereicht

Hartmann I., Hollweck T., Haffner S., Krebs M., Meiser B., Reichart B. and Eissner G., Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties, *J Immunol. Methods* 363 (1), 15-12-2010, 80-89

Kongressbeiträge

Eissner G., Hollweck T., Hartmann I., Noor S., Meiser B., Reichart B., Mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue differentiate into cardiomyocytes and constitute an alternative candidate for cardiac tissue engineering. *Stem Cells 2009*, Antigua

Eissner G., Hollweck T., Hartmann I., Marschmann M., Haffner S., Reichart B., Mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue differentiate into cardiomyocytes and constitute an alternative candidate for cardiac tissue engineering. *EMBO Workshop 2010*, Brescia

Eissner G., Hollweck T., Hartmann I., Reichart B. und Überfuhr P., Immune properties and regenerative potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord tissue. *TERMIS-EU annual meeting 2011*, Granada

Anhang A: Besiedelungsuntersuchung von Explantaten

Einleitung

Hypoplastisches Linksherzsyndrom

Definition & Ursache

Beim hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS) handelt es sich um eine angeborene Fehlbildung des Herzens und der Hauptschlagader (Aorta). Ursache dafür ist neben einem Verschluss oder einer Verengung (Stenose) der Herzklappe zwischen Aorta und linker Herzkammer und/oder zwischen linkem Vorhof und linker Herzkammer eine unterentwickelte Aorta sowie eine unterentwickelte oder fehlende linke Herzkammer. Die daraus resultierende Mischung von sauerstoffreichem mit sauerstoffarmem Blut führt zu einer Minderperfusion des Körperkreislaufes und damit zu einer Sauerstoffunterversorgung der Organe. Ohne Therapie liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei 4 bis 7 Tagen [99].

Konventionelle Therapie

Die 3-stufige Palliation mittels der sogenannten Norwood-Operationstechnik umschließt zunächst eine erste lebenserhaltende Operation, wobei die unterentwickelte Aorta mittels eines Homografts (Gewebeimplantat eines Organismus gleicher Spezies) erweitert und mit der Pulmonalarterie verbunden wird. Um den Lungen venöses Blut zur Oxygenierung zuzuführen, wird ein Shunt (Kunststoffröhrchen aus expandiertem Polytetrafluorethylen, ePTFE) zwischen der Pulmonalarterie und dem rechten Ventrikel implantiert [107].

Im Alter von vier bis sechs Monaten erfolgt die zweite Stufe, die Hemi-Fontan-Operation. Dabei wird die obere Hohlvene mit der Pulmonalarterie verbunden und der Shunt zwischen der Pulmonalarterie und dem rechten Ventrikel entfernt. Um einen Blutfluss aus der unteren Hohlvene in die Lunge zu verhindern, wird in den rechten Vorhof ein Patch (Kunststoffflicken aus ePTFE) eingenäht, wodurch das Implantat auf der einen Seite mit sauerstoffarmen und auf der anderen Seite mit sauerstoffreichem Blut in Kontakt kommt.

Nach etwa zwei bis drei Jahren wird im letzten Schritt der Patch im Bereich des Vorhofes entfernt und die Komplettierung der Kreislauffrennung durchgeführt. Dies geschieht durch den Anschluss der unteren Hohlvene an die Pulmonalarterie sowie durch die Implantation und Fenestrierung eines weiteren Patches in der seitlichen Wand des Vorhofes [32].

Nach Korrektur des Herzfehlers sind HLHS-Patienten prädestiniert für Thrombosen im Implantatbereich, was eine anschließende Antikoagulationstherapie erfordert [133].

Material & Methoden

Norwood-Operation

Zur kinderherzchirurgischen Therapie des hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS) wurden sogenannte Norwood-Operationen von Frau Dr. Januszweska, Herzchirurgische Klinik der Universität München durchgeführt.

Beim hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS) handelt es sich um eine angeborene Fehlbildung des Herzens und der Aorta. Zur Korrektur der Fehlbildung wird vorübergehend ein Shunt (IMPRA® ePTFE Vascular Graft, BARD, Tempe, USA bzw. Gore-Tex Vascular Graft, W.L. Gore & Associates, Dundee, Scotland, UK) zwischen der Pulmonalarterie und dem rechten Ventrikel implantiert, um den Lungen venöses Blut zur Oxygenierung zuzuführen. Um einen Blutfluss aus der unteren Hohlvene in die Lunge zu verhindern, wird zudem ein Patch (IMPRA® ePTFE Vascular Graft, BARD, Tempe, USA) in den rechten Vorhof eingenäht. Das Implantat kommt dabei auf der einen Seite mit sauerstoffarmen und auf der anderen Seite mit sauerstoffreichen Blut in Kontakt. Nach Komplettierung der mehrstufigen Kreislaufftrennung werden die Implantate wieder entfernt.

Charakterisierung explantierter Patches

Nach Explantation der Implantate wurden diese auf eine generelle Besiedelung und insbesondere auf eine Endothelialisierung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration immunhistologisch untersucht. Zudem wurden die Zellmorphologie sowie die Dichte der Besiedelung rasterelektronenmikroskopisch bestimmt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Explantierte Patches und Shunts wurden über Nacht bei 4 °C in 3 % Glutardialdehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entwässert:

3 x 5 min bei RT in 30 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 56 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 70 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 96 % EtOH in Aqua dest.

3 x 5 min bei RT in 100 % Aceton

1 x 5 min bei -20 °C in 100 % Aceton

Nach Fixierung und Dehydratation der Explantate erfolgte die sogenannte Kritisch-Punkt-Trocknung. Dabei wird der Austausch von Aceton durch flüssiges CO₂ in sechs bis acht Schritten in einer Druckkammer bei 5 bis 10 °C und einem Druck von 40 bar mit anschließender Erwärmung über den kritischen Punkt von CO₂ gewährleistet. Voraussetzung der REM-Analyse biologischer Proben ist das Beschichten des zu analysierenden Materials beispielsweise mit Gold. Dafür wurde mittels eines Kathodenzerstäubers eine 10 bis 30 nm starke Goldschicht auf die Oberfläche des Biomaterials aufgebracht. Im Anschluss daran konnte die Probe rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden.

Immunhistologie

Die im Folgenden beschriebene Kunststoffeinfettung (Technovit 8100, 3040; Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, D; siehe Abbildung 1) wurden anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dabei erfolgten die Fixierung, Entwässerung und Infiltration des Probenmaterials unter permanenter Bewegung.

Fixierung

Um die Zellen der *in vivo* besiedelten Patches/Shunts in ihrem Ursprungszustand zu konservieren, wurden die Explantate in PBS (PAA Laboratories, Pasching, A) gewaschen und 3-4 h bei 4 °C in 2 % Paraformaldehyd in Phosphatpuffer pH 7,4 (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D) fixiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht im Phosphatpuffer pH 7,4 mit einem Zusatz von 6,8 % Saccharose (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D) bei 4 °C gewaschen.

Entwässerung

Die Entwässerung der Explantate erfolgte in 100 % Aceton (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 60 min bei 4 °C. Während der ersten 5 min wurde dabei das Aceton so häufig gewechselt, bis keine Trübung mehr zu erkennen war.

Infiltration

Die Infiltration des Gewebes wurde für 6-10 h bei 4 °C in Technovit 8100 durchgeführt, wobei die Infiltrationslösung aus 100 ml Basislösung unter Zusatz von 0,6 g Härter I bestand.

Einbettung

Als Einbettmittel wurde die Infiltrationslösung im Verhältnis 30:1 mit Härter II bei 4 °C vermischt. In dieser Lösung wurden die einzubettenden Proben ca. 5 min bewegt. Anschließend wurden die Mulden der Histoform mit der Einbettlösung gefüllt und das Gewebe darin orientiert. Die bis zum Rand gefüllte Mulde wurde dann umgehend mit der Folie luftdicht abgedeckt und die Kaltpolymerisation über Nacht auf Eis bei 4 °C durchgeführt.

Aufblocken

Nach Abschluss der Polymerisation wurde die Abdeckfolie abgenommen und ein Histobloc in die Aussparung der Einbettform aufgesetzt. Anschließend wurden die rückseitigen Vertiefungen des Histoblocs mit Technovit 3040 im Mischungsverhältnis von zwei Teilen Pulver und einem Teil Flüssigkeit ausgegossen. Nach etwa 5-10 min konnten die Proben dann entfernt werden und waren sofort schneidfähig.

Schneiden

Mittels eines Rotationsmikrotomes (RM 2165; Leica GmbH, Wetzlar, D) wurden von den eingebetteten Explantaten, 5 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem Wasserbad bei RT gestreckt und nach Aufziehen auf einen Objektträger bei RT getrocknet.



Abbildung 1. Immunhistochemische Untersuchung von explantierten Implantaten einer Norwood-Operation, hinsichtlich einer generellen Besiedelung und Endothelialisierung. Implantatfixierung,-entwässerung und -infiltration in einer 24-Well-Platte (A), Einbettung in eine Histoform (B), Schneiden der aufgeblockten Proben am Mikrotom (C).

Färbung auf Faktor VIII verwandtes Antigen (von Willebrand Faktor, vWF)

Die gegebenenfalls bei 4 °C gelagerten Schnitte wurden auf RT gebracht und für 2 min mit 100 % Aceton vorbehandelt.

Die Gewebeproben wurden mit 150 µl einer auf 37 °C temperierten 0,05 % Trypsin/EDTA (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) Lösung bedeckt und unter Brutschrankbedingungen für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in PBS unter 4-5 maligen Pufferwechsel gewaschen.

Zum Nachweis, ob Endothelzellen die Patches/Shunts *in vivo* besiedelt hatten, wurde ein polyklonaler Primärantikörper rabbit anti-human von Willebrand Faktor (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) verwendet, der die sog. *Weibel-Pallade bodies* spezifisch in Endothelzellen anfärbt. Dieser wurde in PBS mit Zusatz von 10 % FBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A) auf eine Konzentration von 8,25 mg/l verdünnt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Schnitte wurden danach erneut für 10 min in PBS unter 4-5 maligen Pufferwechsel gewaschen.

Der Sekundärantikörper goat anti-rabbit IgG Fragment-FITC (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D) wurde in PBS/10 % FBS in einer Konzentration von 22 µg/ml für 1 h bei 37 °C eingesetzt. Im Anschluß wurden die Schnitte wiederum für 10 min in PBS unter

4-5 maligen Pufferwechsel gewaschen und eine Kerngegenfärbung mit DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS für 20 min bei RT durchgeführt.

Nach einmaligem Waschen der Proben in PBS wurden diese letztlich mit Eukitt (Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D) eingedeckt und bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm (Emission 517 nm) mikroskopiert.

Ergebnisse

Besiedelungs- & Endothelialisierungsnachweis

Die zur Therapie des hypoplastischen Linksherzsyndroms eingesetzten Implantate wurden nach Explantation auf eine Besiedelung im Allgemeinen, und auf eine Endothelialisierung im Besonderen, immunhistologisch untersucht. Dabei erfolgte der Nachweis einer potentiellen Besiedelung mittels Zellkernfärbung, wobei eine mögliche Endothelialisierung durch die Detektion des endothelspezifischen „Faktor VIII-verwandten Antigens (FVIIIrAg, von-Willebrand-Faktor)“ erfolgte.

Bei der Untersuchung von Patches wurde der Kontakt mit Blut unterschiedlicher Sauerstoffsättigung berücksichtigt. Die Besiedelungsanalyse von Shunts, zur Verbindung der Pulmonalarterie mit dem rechten Ventrikel, erfolgte in Abhängigkeit der Anastomosenlokalisation. Dabei wurde zwischen dem des rechten Ventrikels und dem der Pulmonalarterie zugewandten Abschnittes des Shunts sowie der Shunt-Mitte unterschieden.

Etablierung der Immunhistologie

Eine immunhistologische Untersuchung der Explantate anhand von Paraffinschnitten war nicht möglich, da sich das Explantat während des Schneidevorgangs aus dem Schnitt löste. Dies ist auf den Dichteunterschied zwischen dem Implantatwerkstoff ePTFE und dem Einbettmaterial Paraffin zurück zu führen. Daher wurde zur Einbettung der Explantate ein auf Hydroxyethylmethacrylat basierender Kunststoff (Technovit 8100) verwendet.

Die Einbettung der Explantate in Technovit 8100 ermöglichte die Anfertigung von intakten Schnitten, schränkte allerdings die Palette verwendbarer Antikörper ein, da nur wenige Antikörper als kunststoffgängig beschrieben sind. Die Eignung entsprechender Antikörper wurde daher an Kunststoffschnitten einer Nabelschnurvene, die als Positivkontrolle der Zellbesiedelung sowie einer Endothelialisierung diente, überprüft.

Abbildung 2 zeigt eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer immunhistologisch aufgearbeiteten Nabelschnurvene im Querschnitt.

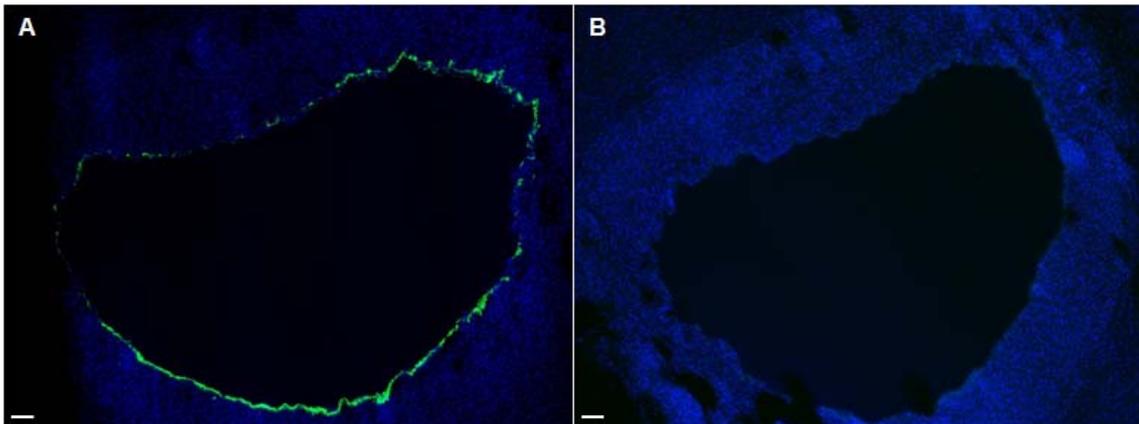


Abbildung 2. Querschnitt einer Nabelschnurvene als Positivkontrolle der Zellkern- und von-Willebrand-Färbung an kunststoffeingebetteten Gewebe. Durch die spezifische Fluoreszenz der Venenintima (A; grün) ist die Kunststoffgängigkeit des Primär- und des Sekundärantikörpers gezeigt. Die Kontrolle unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers zeigt eine vernachlässigbare Fluoreszenz der Venenintima (B). Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt (A, B; blau). Maßstabsbalken = 100 μm ; Vergrößerung 50 x.

Anhand der Anwesenheit von Zellkernen (blau) im gesamten Gewebe wird eine vollständige Zellbesiedelung des perivaskulären Bereiches deutlich. Darüber hinaus ist durch die Positivfärbung der Venenintima, die Expression des endothelspezifischen “von-Willebrand-Faktors“ und damit eine Endothelialisierung nachgewiesen, wodurch wiederum die Kunststoffgängigkeit der verwendeten Antikörper bestätigt wird. Die vernachlässigbare Fluoreszenz der Venenintima in der Kontrollfärbung widerlegt die Möglichkeit der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers.

Immunhistologie explantierter Patches

Nach Etablierung der immunhistologischen Aufarbeitung wurden vier Patches hinsichtlich einer Besiedelung und Endothelialisierung untersucht. Der Nachweis einer generellen Besiedelung erfolgte durch eine Zellkernfärbung mittels DAPI. Das Vorliegen von Endothelzellen wurde mittels Färbung des endothelspezifischen Faktor VIII verwandten Antigens untersucht. Dabei wurde zwischen der Explantatoberseite, die mit sauerstoffarmem Blut (50 % Sauerstoffsättigung) in Kontakt kam, dem Explantatinneren und der Explantatunterseite, die mit sauerstoffreichem Blut (80 % Sauerstoffsättigung) in Kontakt kam, unterschieden.

Die Untersuchung der Patches hinsichtlich einer Endothelialisierung zeigte bei drei von vier Patches die Anwesenheit von Endothelzellen auf der Explantatoberfläche. Dabei wurde allerdings kein Unterschied zwischen der Explantatoberseite, die mit sauerstoffarmem Blut in Kontakt kam und der Explantatunterseite, die mit sauerstoffreichem Blut in Kontakt kam, festgestellt. Im Explantation-Inneren konnten dagegen keine Endothelzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3).

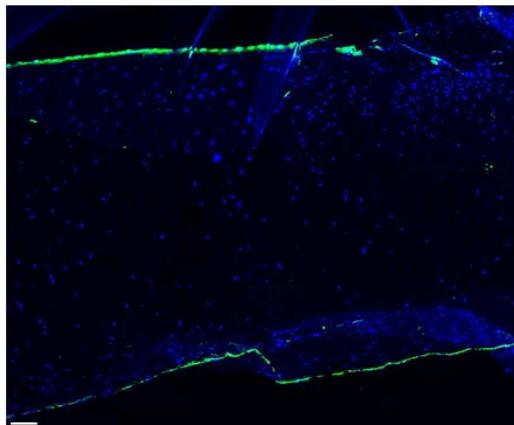


Abbildung 3. Querschnitt eines explantierten Patches nach immunhistologischer Aufarbeitung. Die Ober- und Unterseite des Patches sowie das Patch-Innere ist mit Zellen besiedelt (blau). Endothelzellen liegen auf der Ober- und Unterseite des Patches vor (grün) Die Abbildung ist repräsentativ für Untersuchungen an Explantaten von vier verschiedenen Patienten (n=4). Maßstabsbalken = 100 μ m ; Vergrößerung 50 x.

Nachfolgend ist eine Übersicht der histologischen Untersuchungen explantierter Patches gezeigt. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, sind alle vier untersuchten Patches auf der Oberseite und auf der Unterseite sowie im Patch-Inneren mit Zellen besiedelt.

PATCH (n=4)	Histologischer Nachweis	
	Generelle Besiedelung Nachweis durch DAPI-Kernfärbung	Endothelzellen Nachweis durch Faktor VIII-Färbung
Patch-Oberseite (50 % Sauerstoffsättigung)	n = 4	n = 3
Patch-Inneres	n = 4	n = 0
Patch-Unterseite (80 % Sauerstoffsättigung)	n = 4	n = 3

Tabelle 1. Übersicht der histologischen Untersuchungen an explantierten Patches die zur Therapie des hypoplastischen Linksherzsyndroms implantiert wurden. Die Patch-Oberseite kam in vivo mit sauerstoffarmem Blut von 50 % Sauerstoffsättigung und die Patch-Unterseite mit sauerstoffreichem Blut von 80 % Sauerstoffsättigung in Kontakt. Der Nachweis einer generellen Besiedelung von Patches mit Zellen erfolgte durch die Anfärbung von Zellkernen mit DAPI. Das Vorliegen von Endothelzellen wurde mittels einer Färbung gegen das Faktor VIII verwandte Antigen untersucht. Alle vier untersuchten Patches zeigten unabhängig von der Sauerstoffsättigung auf der Patch-Oberseite, Patch-Unterseite und im Patch-Inneren eine Zellbesiedelung. Eine Endothelialisierung war bei drei von vier untersuchten Patches auf der Patch-Oberseite und auf der Patch-Unterseite gegeben. Im Patch-Innerem konnten keine Endothelzellen nachgewiesen werden. Diese Daten stammen von vier verschiedenen Patienten (n=4).

Immunhistologie explantierter Shunts

Die histologische Besiedelungsuntersuchung von Shunts erfolgte an drei Explantaten in Abhängigkeit der Anastomosenlokalisierung, wobei zwischen dem des rechten Ventrikels und dem der Pulmonalarterie zugewandten Abschnittes des Shunts sowie der Shunt-Mitte unterschieden wurde. Der Nachweis einer generellen Besiedelung erfolgte durch eine Zellkernfärbung mittels DAPI. Das Vorliegen von Endothelzellen wurde mittels Färbung des endothelspezifischen Faktor VIII verwandten Antigens untersucht. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der histologischen Untersuchung explantierter Shunts zusammen.

SHUNT (n=3)	Histologischer Nachweis	
	Besiedelung Nachweis durch DAPI-Kernfärbung	Endothelzellen Nachweis durch Faktor VIII-Färbung
Shunt-Abschnitt zur Pulmonalarterie	n = 3	n = 3
Shunt-Mitte	n = 1	n = 0
Shunt-Abschnitt zum rechten Ventrikel	n = 3	n = 1

Tabelle 2. Übersicht der histologischen Untersuchungen an explantierten Shunts die zur Therapie des hypoplastischen Linksherzsyndroms implantiert wurden. Die eine Seite des Shunts war der Pulmonalarterie, die andere Seite des Shunts dem rechten Ventrikel zugewandt. Der Nachweis einer generellen Besiedelung von Shunts mit Zellen erfolgte durch die Anfärbung von Zellkernen. Das Vorliegen von Endothelzellen wurde mittels einer Färbung gegen das Faktor VIII verwandte Antigen untersucht. Alle drei untersuchten Shunts zeigten an der der Pulmonalarterie zugewandten Seite und an der dem rechten Ventrikel zugewandten Seite eine Zellbesiedelung. In der Shuntmitte konnten nur bei einem von drei untersuchten Shunts eine Zellbesiedelung festgestellt werden. Der Abschnitt zur Pulmonalarterie wies bei allen drei untersuchten Shunts eine Endothelialisierung auf, wobei der Abschnitt zum rechten Ventrikel dagegen bei einem und in der Shunt-Mitte bei keinem von drei untersuchten Shunts mit Endothelzellen besiedelt war. Diese Daten stammen von drei verschiedenen Patienten (n=3).

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, wurde bei allen drei untersuchten Shunts eine Besiedelung nachgewiesen. Allerdings zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Besiedelung. Von drei untersuchten Shunts, zeigten alle drei eine Besiedelung an dem der Pulmonalarterie und an dem des rechten Ventrikels zugewandten Abschnittes des Shunts. Eine Besiedelung der Shunt-Mitte war lediglich einmal festzustellen. Endothelzellen fanden sich an dem der Pulmonalarterie zugewandten Abschnitt bei allen drei untersuchten Shunts (Abbildung 4 A). In einem Fall fanden sich Endothelzellen auch Ventrikel-seits, in der Shunt-Mitte in keinem Fall (Abbildung 4 B).

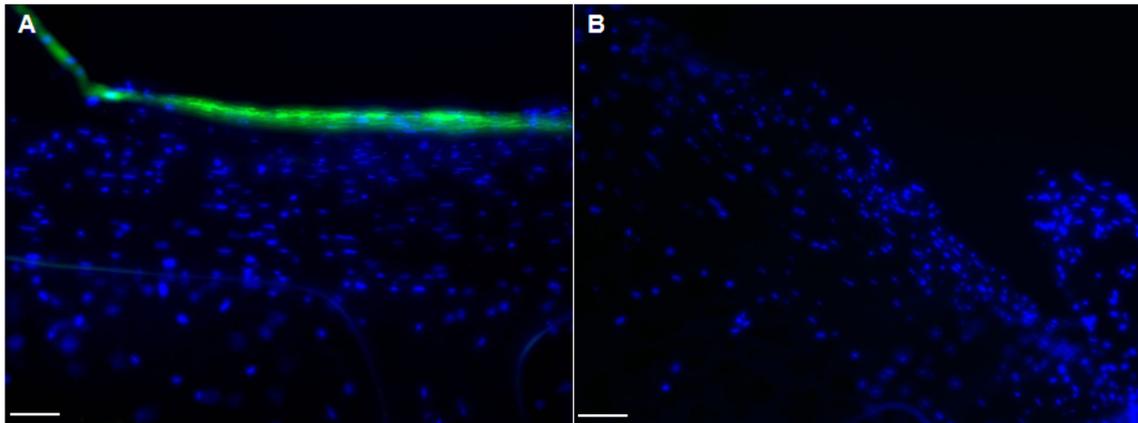


Abbildung 4. Querschnitt eines explantierten Shunts nach immunhistologischer Aufarbeitung. Der der Pulmonalarterie zugewandte Abschnitt (A) zeigt neben einer generellen Zellbesiedelung (blau) auch eine Endothelialisierung (grün). Die Shunt-Mitte (B) weist eine Zellbesiedelung (blau) jedoch ohne Endothelzellen auf. Die Abbildung ist repräsentativ für Untersuchungen an Explantaten von drei verschiedenen Patienten (n=3). Maßstabsbalken = 50 μm ; Vergrößerung 200 x.

Besiedelungsdichte & -morphologie

Topographie explantierter Patches

Neben der immunhistologischen Untersuchung an vier Patches wurden zudem drei dieser Patches zur Bestimmung der Besiedelungsdichte sowie der Besiedelungsmorphologie rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Besiedelungsdichte schwankte stark von Patch zu Patch (0-100%). Die morphologische Charakterisierung zeigte auf der Patch-Oberseite und Patch-Unterseite gleichermaßen flächige, schuppenförmige Zellen (siehe Abbildung 5).

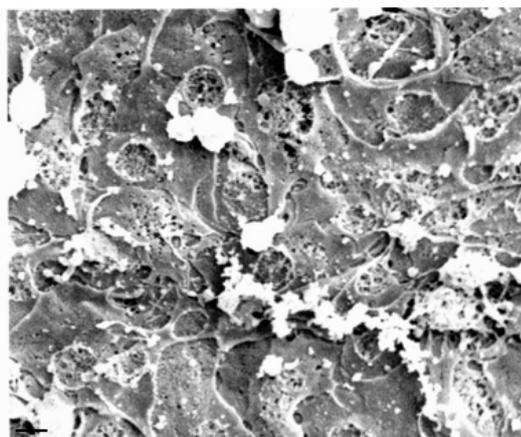


Abbildung 5. Oberflächentopographie eines explantierten Patches nach rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung. Die Ober- und Unterseiten der Patches weisen eine flächige schuppenförmige Besiedelung auf. Die Abbildung ist repräsentativ für Untersuchungen an Explantaten von drei verschiedenen Patienten (n=3). Maßstabsbalken = 1 μm ; Vergrößerung 5000 x.

Topographie explantierter Shunts

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Besiedelungsdichte & -morphologie von Shunts erfolgte an vier Explantaten, wobei drei dieser Shunts zusätzlich immunhistologisch (siehe Abbildung 4) untersucht wurden.

Die Besiedelungsdichte schwankte auch hier zwischen 50 % und 100 %. Das Erscheinungsbild der Zellen bei beiden Abschnitten reichte von flächigen Zellen (siehe Abbildung 6 A) bis hin zu einem netzartigen Zellrasen mit langen Ausläufern (siehe Abbildung 6 B).

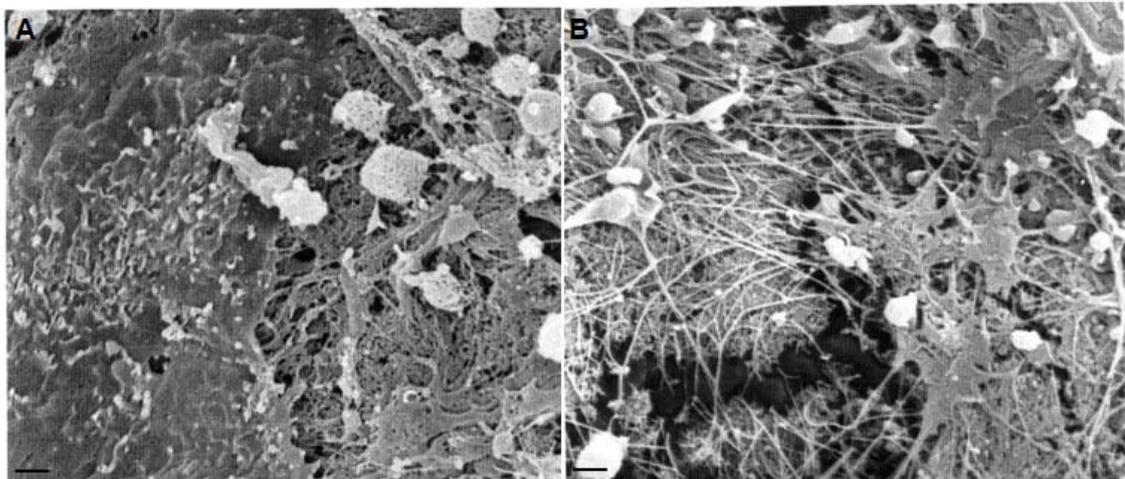


Abbildung 6. Oberflächentopographie eines explantierten Shunts nach rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung. Die der Pulmonalarterie zugewandten Abschnitte sowie die dem rechten Ventrikel zugewandte Abschnitte der Shunts weisen eine Zellbesiedelung mit flächiger (A) bis netzartiger Morphologie (B) auf. Die Abbildung ist repräsentativ für Untersuchungen an Explantaten von vier verschiedenen Patienten (n=4). Maßstabsbalken = 1 μm ; Vergrößerung 5000 x.

Diskussion

Die chirurgische Trennung des Lungen- und des Körperkreislaufes ist die einzige Therapie des hypoplastischen Linksherzsyndroms. Die verwendeten synthetischen Implantate aktivieren allerdings bei Blutkontakt die Gerinnungskaskade und verursachen thrombotische Komplikationen [114]. Dies erfordert wiederum eine mit vielen Nebenwirkungen behaftete Antikoagulationstherapie. Native Oberflächen die mit Blut in Kontakt stehen, sind unter anderem zur Vermeidung von Thromben mit dem sogenannten Endothel, einer ebenen Schicht aus Endothelzellen, versehen [72]. Wäre von einer vollständigen Endothelialisierung der Implantate *in vivo* auszugehen, ist möglicherweise eine verminderte Antikoagulation denkbar. Explantierte Patches und Shunts aus ePTFE wurden daher nach Norwood-Operationen hinsichtlich einer Besiedelung mit Endothelzellen immunhistologisch sowie rasterelektronen-

mikroskopisch untersucht. Dabei zeigten zwar alle untersuchten Patches eine zelluläre Beschichtung, allerdings wiesen nicht alle Patches Endothelzellen auf der Explantatoberfläche auf. Bei allen untersuchten Shunts fanden sich an dem der Pulmonalarterie zugewandten Abschnitt Endothelzellen, allerdings waren Endothelzellen nicht in allen Fällen Ventrikel-seits und in der Shunt-Mitte vorhanden. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Nakano et al. kann daher keine vollständige *in vivo* Endothelialisierung von Implantaten aus ePTFE erwartet werden [89], wodurch auf eine Antikoagulationstherapie nicht verzichtet werden kann.

Anhang B: Material

Geräte

Geräte	Hersteller
Druckmonitor Sirecust 304D	Siemens AG, München, D
Drucktransducer P231D	Gould-Statham Inc., Oxnard, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg, D
ELISA Reader Multiskan® Ex	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Inkubator HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Inkubator HERAcell® 240	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Kathodenzerstäuber SCD050	BAL-TEC, Witten, D
Kritisch-Punkt-Trockner CPD030	BAL-TEC, Witten, D
Lichtmikroskop, aufrecht AxioStar plus	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Lichtmikroskop, invers Axiovert 40 C	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Rasterelektronenmikroskop EVO® LS 10	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Rasterelektronenmikroskop S420	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, D
Sterilbank HERAsafe® KS 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Gefrierbehälter LS6000	Taylor-Wharton GmbH, Mildstedt, D
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D

Kulturgefäße

Gefäße	Hersteller
T25 Zellkulturflaschen	Corning Inc., NY, USA
T75 Zellkulturflaschen	Corning Inc., NY, USA
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
96-Well-Zellkulturplatten	Nunc GmbH & Co.KG, Langenselbold, D
µ-Slide 18 well ibiTreat - flat	ibidi GmbH, München, D

Reagenzien

Reagenz	Hersteller
5-Azazytidin	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, D
Alizarin Rot	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ascorbat-1-phosphat	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Basic-Fibroblast growth factor (b-FGF)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
Bovine serum albumin (BSA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Calcein AM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Dexamethason	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dulbecco`s MEM F-12 (DMEM F-12)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Dulbecco`s MEM high glucose (DMEM hg)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Dulbecco`s MEM low glucose (DMEM lg)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidium Homodimer-1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Formaldehyd 37 %	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Glutardialdehyd Lösung 25 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
β -Glycerolphosphat	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Horse serum	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Hyaluronidase	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
IMM Mounting Medium	Ibidi GmbH, Martinsried, D
Indomethacin	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Kollagenase I	Biochrom AG, Berlin, D
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
MEM nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
β -Mercaptoethanol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
MesenCult® MSC Basal Medium	Stemcell Technologies SARL, Köln, D
MesenCult® Stimulatory Supplement	Stemcell Technologies SARL, Köln, D
MesenCult®-ACF Dissociation Kit	Stemcell Technologies SARL, Köln, D
MesenCult®-XF Attachment Substrate	Stemcell Technologies SARL, Köln, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Oil Red O	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Oxytocin	Wako Chemicals GmbH, Neuss, D
Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 μ g/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Plated-derived growth factor (PDGF)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
Pool-Humanserum (hS) GMP-zertifiziert	Zentrum f. Transfusionsmedizin, Tübingen, D
Propidiumjodid	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Saponin	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
StemPro® MSC SFM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
StemPro® MSC SFM Supplement	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Transforming Growth factor β (TGF- β 1)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
Triton® X-100	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Trypanblau	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
TrypLE™ Express	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
0,05 % Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
WST-1 reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
APC mouse anti-human CD 34	8G12	BD GmbH, Heidelberg, D
APC mouse anti-human CD 45	H130	BD GmbH, Heidelberg, D
APC mouse anti-human CD 73	AD2	BD GmbH, Heidelberg, D
APC mouse anti-human CD 90	5E10	Biozol, Eching, D
APC mouse anti-human CD 105	43A3	Biozol, Eching, D
APC mouse anti-human HLA-DR	L243	BD GmbH, Heidelberg, D
Goat anti mouse IgG, Alexa 488 conjugate	polyklonal	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Goat anti rabbit IgG, FITC conjugate	polyklonal	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Mouse IgG1, APC conjugated	X40	BD GmbH, Heidelberg, D
Mouse IgG2a, APC conjugated	X39	BD GmbH, Heidelberg, D
Mouse monoclonal anti Myosin	NOQ7.5.4D	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Mouse monoclonal anti-Actin, cardiac	AC1 20.4.2	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Mouse monoclonal anti-Actinin	5A-53	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Mouse monoclonal anti-Connexin 43	4E6.2	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Mouse monoclonal to alpha actin (sarcomeric)	5C5	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, D
Mouse monoclonal to alpha Actinin (sarcomeric)	5A-53	Zytomed Systems GmbH, Berlin, D
Mouse monoclonal to cardiac Troponin C	1A2	Abcam Inc., Cambridge, UK
Mouse monoclonal to cardiac Troponin I	284(19C7)	Abcam Inc., Cambridge, UK
Mouse monoclonal to GATA4	L97-56	BD GmbH, Heidelberg, D
Mouse monoclonal to Myosin Heavy Chain	TH81	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Rabbit polyclonal to cardiac Troponin T	polyklonal	Abcam Inc., Cambridge, UK

Zellträger

Zellträger	Hersteller
GORE-TEX® Dualmesh® Biomaterial	W.L. Gore & Associates GmbH, Putzbrunn, D
GORE-TEX® Cardiovascular Patch	W.L. Gore & Associates GmbH, Putzbrunn, D

Bioreaktor

Werkstoff	Hersteller
Plexiglas	Sahlberg GmbH & Co. KG, München, D
Polyvinylchlorid	Sahlberg GmbH & Co. KG, München, D
Rostfreier Stahl	Inoxium Edelstahlhandel, Rosenheim, D
Silikon	Sahlberg GmbH & Co. KG, München, D
Teflon®	Sahlberg GmbH & Co. KG, München, D

Bauteil	Hersteller
Drehzahlsteller 5 A	H-Tronic GmbH, Hirschau, D
Getriebemotor RB 35 1 :100	Modelcraft Inc., Blaine, USA
Steckernetzgerät SNG12-24W	Conrad Electronic SE, Hirschau, D

Software

Software	Hersteller
AxioVision Rel. 4.8	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
CATIA V5R19	IndustrieHansa GmbH, München, D
SmartPI™	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D

Anhang C: Datenblatt Getriebemotor

Getriebemotor RB-35

Beschreibung

Hervorragend verarbeitet, hohe Widerstandsfähigkeit, leise, klein und dennoch mit hohem Wirkungsgrad. Die Ein- und Ausgangswellen sind leicht versetzt.

Ausstattung

- Motor-Leerlaufdrehzahl 6000 U/min
- Motor-Lastdrehzahl 4650 U/min
- Motor-Drehmoment 35 g/cm
- Motor-Leerlauf-Stromaufnahme ca. 80 mA (ohne Getriebe)
- Motoren-Stromaufnahme unter Last ca. 300 mA
- Motoren-Ø 35 mm
- Getriebe-Ø 37 mm
- Wirkungsgrad 66 %.

Technische Daten

Betriebsspannung	12 V
Last-Drehzahl	52 U/min
Abm.	(Ø) 37 mm
Untersetzung	1:100
Max. Getriebe-Belastung	18 kg/cm · permanent 6 kg/cm
Spitzen-Drehmoment	180 Ncm
Leerlauf-Drehzahl an Nennspannung	60 U/min
Wellen-Ø	6 mm
Wellen-Länge	12 mm
Max. Laststrom	2.1 A
Nennspannung	12 V

Anhang D: Datenblatt Steckernetzteil

Steckernetzteil SNG12-24W

Highlights & Details

- Ausgang 3 - 12 V/DC
- Max. 2000 mA

Beschreibung

Getaktetes Steckernetzteil für stabile Ausgangsspannungen. Die Geräte sind mit verpolungsgeschützten Ausgangssteckern versehen. Ideal für Kleinverbraucher wie Taschencomputer, Cassetten-Walker, CD-Portable, Mini-TV etc. mit einer Stromaufnahme bis zu 2000 mA. Das Netzteil ist Überlast geschützt. Mit 1,5 m DC-Anschlusskabel.

Ausstattung

- DC-Spannungswahl durch Steckbrücken.

Lieferumfang

- 2 Klinkenstecker 2,5 und 3,5 mm
- 6 Hohlstecker (Außen-/Innen-Ø in mm) 5,5/2,5; 5,5/1,5; 5,5/2,1; 4,0/1,7; 3,5/1,35; 2,35/0,75
- 6 Spannungs-Steckbrücken
- Bedienungsanleitung.

Technische Daten

Typ	Getaktet
Ausgangsstrom	2000 mA
Typ	SNG12-24W
Ausgangsspannung	3/4.5/6/7.5/9/12 V/DC
Abm.	(B x H x T) 50 x 68 x 109 mm
Typ	SNG12-24W
Gewicht	240 g
Leistung	24 W
EuP Status	Nein

Anhang E: Datenblatt Drehzahlsteller

5 A Drehzahlsteller für Gleichstrom-Motoren

Highlights & Details

- Immer die richtige Drehzahl

Beschreibung

Diese Impulsbreitensteuerung dient zur stufenlosen Helligkeitsregelung von Glühlampen oder zur Drehzahlregelung von Kleinbohrmaschinen und anderen Gleichstrom-Motoren. Der Einstellbereich erstreckt sich von 0 bis 100%. Eine einstellbare Strombegrenzung (nur Bausatz-Version) schützt die Schaltung bei Kurzschluss oder Blockieren der Motorwelle.

Baustein-Version: Ohne einstellbare Strombegrenzung.

Technische Daten

Betriebsspannung	9 - 18 V/DC
Ausgangsleistung	5 A
Ausführung	Baustein
Abm.	(L x B) 100 mm x 70 mm

Anhang F: Mikrobiologische Befunde

Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern - Medizinische Mikrobiologie, Marchionistr. 17, 81377 München, Telefon: (089) 2180/78204
Prof.Dr.Dr.J.Heesemann, Arzt für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Medizin. Mikrobiologie, Marchionistr.17, 81377 München KLINIKUM Grosshadern HOMOGRAFTLABOR FR.UHLIG HERZCHIR.KLINIK	BIOREAKTOR MEDIUM NACH 24H geb.: 10092010 Material: Homograft-Medium Eingangsdatum: 10-09-2010 Entnahmedatum: 10-09-2010 Nr.: B10_070850
Kultur Kein aerobes Wachstum	
Beurteilung: Negativer mikrobiologischer Befund (Ohne Unterschrift gültig)	
München, 13-09-2010	i.A.Dr.Eder/Ma

Mengenangaben bedeuten: +++ viel, ++ mässig viel, + wenig, (+) sehr wenig

Max von Pettenkofer-Institut

für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Klinikum Großhadern - Medizinische Mikrobiologie, Marchioninstr. 17, 81377 München, Telefon: (089) 2180/78204
 Prof.Dr.Dr.J.Heesemann, Arzt für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Medizin. Mikrobiologie, Marchioninstr.17, 81377 München	BIOREAKTOR MEDIUMNACH 96H geb.: 13092010 Material: Sonstiges
KLINIKUM Grosshadern HOMOGRAFTLABOR FR.UHLIG	Eingangsdatum: 01-10-2010 Entnahmedatum: 01-10-2010
HERZCHIR.KLINIK	Nr.: B10_076815
Kultur Kein aerobes Wachstum	
Sproßpilze nicht nachgewiesen.	
Beurteilung: Negativer mikrobiologischer Befund (Ohne Unterschrift gültig)	
München, 11-10-2010	i.A.PD.Dr.Schubert/KK

Mengenangaben bedeuten: +++ viel, ++ mässig viel, + wenig, (+) sehr wenig