

Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese und Kultivierung in einem speziell entwickelten Bioreaktorsystem

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Sebastian Heene, M. Sc.

2022

Referentin: Prof. Dr. med. Cornelia Blume

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 17.11.2021

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Cornelia Blume für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover anzufertigen. Die Vielseitigkeit der unterschiedlichen Themenbereiche, an denen ich während der letzten Jahre gearbeitet habe, hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper für die Aufnahme am Institut und die Übernahme des Korreferats bedanken sowie dafür, mich überhaupt erst auf den Studiengang Life Science gebracht zu haben. Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Lee-Thedieck bedanke ich ebenfalls für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Allen anderen am TCI danke ich auch für die tolle Zeit dort, besonders bei allen Mitgliedern der AG Blume. Ihr habt sehr dazu beigetragen, dass die Arbeit immer Spaß gemacht hat, besonders du, Nina. Ich kann mir keine bessere Büropartnerin vorstellen.

Für den tollen Rat bei Problemen und die Unterstützung bei technischen Problemen möchte ich mich bei Martina Weiß, Martin Pähler, Thorsten Stempel, Friedbert Gellermann, Christian Ude und Iliyana Pepelanova bedanken. Bei Patrick Lindner bedanke ich mich für die Bereitstellung von Software zur Analyse meiner Daten.

Ich möchte ich mich auch bei allen bedanken, die bei mir ihre Abschlussarbeiten geschrieben haben und auch meine Arbeit damit unterstützt haben: Sebastian, Nils, Gresa und Jannis.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Susanne, die mich in den letzten Monaten tatkräftig unterstützt hat und mich immer motivieren konnte weiterzumachen, und bei meiner Familie bedanken, welche all die Jahre an mich geglaubt hat.

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in unserer modernen Gesellschaft. Diese treten typischerweise aufgrund einer Stenose oder einer Okklusion eines Blutgefäßes auf, wodurch es zu einem verringerten Blutfluss und somit zu einer Unterversorgung des Gewebes durch einen Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff kommt. Eine chirurgische Behandlung erfolgt oft durch die Verwendung einer Gefäßprothese, welche zur Überbrückung oder zum Austausch des erkrankten Blutgefäßes eingesetzt wird. Die Verwendung von autologen Gefäßen, welche allerdings nicht immer verfügbar sind, bildet hierbei den Goldstandard für Gefäße <6 mm. Stehen diese nicht zur Verfügung oder werden größere Gefäße benötigt, werden synthetische Alternativen verwendet. Diese verfügen jedoch über schlechtere Erfolgsraten nach einem längeren Zeitraum und involvieren die andauernde Einnahme gerinnungshemmender Medikamente, um eine erneute Okklusion zu verhindern. Eine mit autologen Zellen und Materialien hergestellte, bioartifizielle Gefäßprothese könnte eine Alternative zur Verwendung rein synthetischer Gefäßprothesen bilden, die deren Nachteile überwindet.

In dieser Arbeit wurden die Polymere Polydioxanon und Fibrin für die Herstellung biohybrider *Scaffolds* als Basis für die Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese untersucht. Sowohl mittels 3D-Druck als auch durch ein Salzlaugungsverfahren konnten Teststrukturen aus Polydioxanon mit einer sehr guten Biokompatibilität und passenden, mechanischen Eigenschaften für das *Tissue Engineering* von Weichgewebe hergestellt werden. Durch eine Besiedelung der Teststrukturen mit Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Zellen gut auf den *Scaffolds* anwachsen und die mechanischen Eigenschaften der degradierenden *Scaffolds* durch zelluläre Strukturen ersetzt werden. Die Herstellung eines künstlichen Gewebes erfordert für die Versorgung der Zellen zusätzlich die Integration eines vaskulären Netzwerks. Zu diesem Zweck wurde eine Strategie zur Vaskularisierung der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* mit humanen, venösen Endothelzellen aus der Nabelschnur und mesenchymalen Stammzellen unter Verwendung eines mit den Wachstumsfaktoren angereicherten Zellkulturmediums innerhalb von sieben Tagen etabliert. Im letzten Teil der Arbeit wurde ein speziell entwickeltes Bioreaktorsystem für die Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese charakterisiert und optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass das System in der Lage ist, physiologische Bedingungen zu erzeugen, welche für die Kultivierung notwendig sind. Die Funktionalität des Systems wurde durch eine Testkultivierung unter quasi-statischen Bedingungen demonstriert.

Schlagwörter: Gefäßprothese, Tissue Engineering, Scaffold, Polydioxanon, Vaskularisierung, Bioreaktor

Abstract

Cardiovascular diseases are the main reason for death in our modern society. Typically, these diseases are associated with stenosis or occlusion of blood vessels, which results in a reduced blood flow and consequently leads to tissue damage due to a shortage of nutrients and oxygen supply. A surgical treatment mostly involves the use of a vascular graft to bypass or replace the affected blood vessel. The gold standard for the treatment of vessels <6 mm is the usage of autologous vessels, but these vessels are not always available. In this case, or for the treatment of larger vessels, synthetic alternatives are used. However, these synthetic grafts display low long-term patency rates in comparison to autologous grafts and demand the perpetual taking of anticoagulant drugs to avoid a newly occlusion of the replaced vessel. A bioartificial vascular graft consisting of autologous cells and materials could represent a promising alternative to currently used completely synthetic vascular grafts and overcome their limitations.

In this work, the polymers polydioxanone and fibrin were evaluated for the production of a biohybrid scaffold that could be used as a basis for the fabrication of a bioartificial vascular graft. With 3d printing as well as with a salt leaching process test structures were produced, which displayed optimal biocompatibility and suitable mechanical properties for the fabrication of soft tissue. By seeding with cells it was shown that the cells grow on the scaffolds and replace the mechanical properties of the degrading scaffold with cellular structures over time. The production of artificial tissue demands the integration of a vascular network for the supply of the cells inside the scaffold. Therefore, a strategy for the vascularization of the scaffolds produced by salt leaching within seven days was developed. This strategy was based on the seeding of the scaffolds with human umbilical vein endothelial cells and mesenchymal stem cells and cultivation using a growth factor enriched cell culture medium. In the final part of this work, a bioreactor system for the cultivation of a bioartificial vascular graft was characterized and optimized. It was demonstrated that the system can recreate physiological conditions which are necessary for the cultivation of a bioartificial vascular graft. The functionality of the system was proven by a test cultivation using quasi-static conditions for the reseeded of a decellularized porcine artery.

Keywords: Vascular Graft, Tissue Engineering, Scaffold, Polydioxanone, Vascularization, Bioreactor

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretischer Hintergrund	3
3.1 Bioartifizielle Gefäßprothesen	3
3.2 <i>Tissue Engineering</i>	3
3.3 Anforderungen an eine bioartifizielle Gefäßprothese	4
3.4 Aufbau und Bedeutung des Gefäßsystems und der verschiedenen Blutgefäßtypen	4
3.5 Physiologie der Vaskularisierung	7
3.6 Herstellung eines Kapillargefäßsystems mittels <i>Tissue Engineering</i>	9
3.6.1 Natürliche Gefäßbildung durch spontane Selbstorganisation	10
3.6.2 Gefäßbildung anhand vorgefertigter Muster	10
3.6.3 Gerichtete Gefäßbildung von Endothelzellen	11
3.6.4 Zellsysteme für eine erfolgreiche Vaskularisierung von <i>Scaffolds</i>	11
3.6.4.1 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	12
3.6.4.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	12
3.7 Funktion und Herstellung von <i>Scaffolds</i> im <i>Tissue Engineering</i>	13
3.7.1 Anforderungen an <i>Scaffolds</i> im <i>Tissue Engineering</i>	13
3.7.2 Materialien für <i>Scaffolds</i> im <i>Tissue Engineering</i>	15
3.7.2.1 Keramiken	15
3.7.2.2 Synthetische Polymere	16
3.7.2.3 Natürliche Polymere	16
3.7.3 Polydioxanon	17

3.7.4	Fibrin	17
3.7.5	Herstellungsmethoden für <i>Scaffolds</i> im <i>Tissue Engineering</i>	18
3.7.5.1	Scaffold-Herstellung mittels 3D-Druck	18
3.7.5.2	Scaffold-Herstellung mittels Partikel-Laugung	19
3.8	Bioreaktoren im <i>Tissue Engineering</i>	19
3.9	Gefäßprothesen	20
3.9.1	Bioprothesen.....	20
3.9.2	Synthetische Gefäßprothesen	21
3.9.3	Bioartifizielle Gefäßprothesen	22
3.9.4	Konditionierung von biohybriden Gefäßstrukturen im geeigneten Bioreaktorsystem.....	22
3.9.5	Bioartifizielle Gefäßprothesen: Stand der Technik	23
4	Ergebnisse	25
4.1	<i>Scaffold</i> -Herstellung und Analyse.....	25
4.1.1	<i>Scaffold</i> -Herstellung.....	25
4.1.1.1	Salzlaugung	25
4.1.1.2	3D-Druck	25
4.1.2	Analyse und Vergleich der <i>Scaffold</i> -Strukturen aus 3D-Druck und Salzlaugung	26
4.1.2.1	Optische Analyse der Oberflächenstruktur	26
4.1.2.2	Analyse der Biokompatibilität mittels CTB-Assay	27
4.1.2.3	Analyse der mechanischen Eigenschaften durch Zugversuche	28
4.1.2.4	Erste Besiedelungen zur Evaluation der Eignung der Scaffold-Konstrukte	29
4.1.2.5	Analyse der Struktur und Degradation von durch Salzlaugung hergestellten Scaffolds	30
4.1.2.6	Fibrinogen-Gewinnung durch Kryopräzipitation und Analyse der Bestandteile	35
4.2	Entwicklung von Kapillaren	38

4.2.1 Optimierung des Zellzahlverhältnisses und der Zellmenge von HUVECs und MSCs und der Zusammensetzung des Zellkulturmediums für eine optimale Netzwerkbildung auf den porösen PDO- <i>Scaffolds</i>	38
4.2.1.1 Erste Optimierung: Auswirkungen des Zellzahlverhältnisses	39
4.2.1.2 Zweite Optimierung: Auswirkungen der Gesamtzellzahl und des verwendeten Zellkulturmediums.....	40
4.2.1.3 Dritte Optimierung: Verbesserung der Medienzusammensetzung	41
4.2.2 Auswirkungen der Zugabe einer definierten Menge an Wachstumsfaktoren zum Zellkulturmedium und Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung der HUVECs....	43
4.2.3 Bedeutung der Fibrin-Beschichtung für die Netzwerkbildung der HUVECs....	44
4.2.4 Verlauf der Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO- <i>Scaffolds</i>	45
4.2.5 Optimierung der Netzwerkbildung: Analyse der Auswirkung der Konzentration von Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium.....	46
4.2.6 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Netzwerkbildung	48
4.2.7 Quantifizierung der Netzwerkbildung mittels AngioTool	49
4.2.8 Abstandsmessung der Netzwerkstrukturen	50
4.2.9 Lumenverifikation mittels Dextran-Assay	50
4.3 Charakterisierung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktorsystem.....	52
4.3.1 Aufbau des Bioreaktorsystems.....	52
4.3.2 Optimierung der Viskosität des Zellkulturmediums durch Zugabe von Methylcellulose	53
4.3.3 Messung der Verweilzeitverteilung.....	55
4.3.4 Analyse der Flussrate abhängig von der Druckdifferenz bei unterschiedlichen Viskositäten der Fluide.....	56
4.3.5 Charakterisierung exemplarischer Druckprofile zur Kultivierung einer Gefäßprothese.....	57
4.3.6 Auswirkungen der Gefäßstruktur in der zentralen Bioreaktorkammer auf Druck und Flussrate beim Anlegen des exemplarischen, hypertonen Druckprofils.....	59

4.3.7	Analyse des resultierenden Scherstresses auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese mittels numerischer Strömungsanalyse.....	60
4.3.7.1	Simulierter Scherstress bei konstanter Flussrate.....	60
4.3.7.2	Simulierter Scherstress bei pulsatiler Flussrate	61
4.3.8	Evaluation des FIA-Systems am Beispiel der Glukoseanalytik.....	63
4.4	Kultivierungskontrolle einer tubulären Gefäßprothese im Bioreaktor	65
4.4.1	Besiedlungsstrategie für eine tubuläre Gefäßprothese	65
4.4.2	Nachweis der Endothelialisierung der Gefäßprothese nach Besiedelung und Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem	66
4.4.2.1	Nachweis einer Zellschicht auf der Gefäßoberfläche durch Auswertung von Paraffinschnitten.....	67
4.4.2.2	Fluoreszenzfärbungen der inneren Gefäßoberfläche	67
4.4.3	Glukoseverbrauch der Endothelzellen auf dem re-zellularisierten Gefäß während der Kultivierung im Bioreaktorsystem	69
4.4.4	Überprüfung des Zellkulturmediums auf eine bakterielle Kontamination nach Kultivierung im Bioreaktorsystem	69
4.4.5	Kultivierungsstrategie für eine bioartifizielle Gefäßprothese: Zusammenfassung	70
5	Diskussion	72
5.1	<i>Scaffold</i> -Herstellung und Analyse	72
5.1.1	<i>Scaffold</i> -Herstellung mittels 3D-Druck.....	73
5.1.2	<i>Scaffold</i> -Herstellung durch Salzlaugung	74
5.1.3	Überprüfung der Biokompatibilität	76
5.1.4	Analyse der mechanischen Eigenschaften	77
5.1.5	Überprüfung der Eignung von PDO als <i>Scaffold</i> -Material durch Test-Besiedelungen	78
5.1.6	Degradation der makroporösen PDO- <i>Scaffolds</i> mit und ohne Besiedelung	79
5.1.7	Geeignete Quellen für Fibrin als natürliche Komponente des biohybriden <i>Scaffolds</i>	80

5.1.8	Fazit: PDO und Fibrin als Materialien für ein biohybrides <i>Scaffold</i>	81
5.2	Entwicklung einer Strategie zur Integration und Quantifizierung eines Kapillarnetzwerks in die biohybriden PDO- <i>Scaffolds</i>	82
5.2.1	Erzeugung eines Kapillarnetzwerks auf biohybriden PDO- <i>Scaffolds</i>	83
5.2.2	Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der gebildeten Netzwerkstrukturen	87
5.2.3	Fazit: Vaskularisierung eines biohybriden <i>Scaffolds</i>	87
5.3	Charakterisierung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktorsystem mit anschließender Test-Besiedelung	88
5.3.1	Eignung des Bioreaktorsystems für die Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese.....	88
5.3.2	Überprüfung der Funktionalität des Bioreaktorsystems durch eine Testkultivierung	91
5.3.3	Fazit: Analyse des Bioreaktorsystems.....	93
6	Zusammenfassung und Ausblick	94
7	Literaturverzeichnis.....	98
	Literaturverzeichnis.....	98
8	Anhang	115
8.1	Zusätzliche experimentelle Daten	115
8.1.1	PDO-Degradation durch Erhitzen	115
8.1.2	Test auf bakterielle Kontamination - qPCR-Ergebnisse	115
8.2	Materialien, Geräte und Software.....	117
8.2.1	Geräte	117
8.2.2	Software	119
8.2.3	Verwendete Chemikalien und Kits	120
8.2.4	Puffer.....	122
8.2.5	Verbrauchsmaterialien	122
8.2.6	Antikörper, Proteine und Farbstoffe.....	123

8.2.7	Zellsysteme und Zellkulturmedium	124
8.3	Methoden	125
8.3.1	<i>Scaffold</i> -Herstellung und Analyse.....	125
8.3.1.1	PDO-Scaffold-Herstellung.....	125
8.3.1.2	Fibrinogen-Aufreinigung aus humanem Blutplasma.....	126
8.3.1.3	Scaffold-Analyse.....	129
8.3.2	Zellkultur	132
8.3.2.1	Grundlagen der Zellkulturtechnik.....	133
8.3.2.2	Herstellung von konditioniertem Zellkulturmedium	134
8.3.3	Besiedelung der porösen <i>PDO-Scaffolds</i> und Auswertung der gebildeten Netzwerkstrukturen	135
8.3.3.1	Scaffold-Besiedelung	135
8.3.3.2	Erste Optimierung: Auswirkungen des Zellzahlverhältnisses	135
8.3.3.3	Zweite Optimierung: Auswirkungen der Gesamtzellzahl und des verwendeten Zellkulturmediums.....	136
8.3.3.4	Dritte Optimierung: Verbesserung der Medienzusammensetzung	136
8.3.3.5	Optimierung der Medienzusammensetzung für Vaskularisierungsversuche auf besiedelten PDO-Scaffolds	137
8.3.3.6	Quantifizierung der Netzwerkstruktur auf den besiedelten PDO-Scaffolds	137
8.3.3.7	Statistische Analyse der Netzwerk-Quantifizierung.....	138
8.3.3.8	Verifikation des Lumens innerhalb der gebildeten Netzwerkstrukturen ..	138
8.3.4	Kultivierung im Bioreaktorsystem	139
8.3.4.1	Neubesiedelung eines dezellularisierten Gefäßes eines Schweines im Bioreaktorsystem.....	139
8.3.4.2	Kultivierung im Bioreaktorsystem.....	139
8.3.4.3	Überprüfung der Sterilität des Zellkulturmediums nach Kultivierung im Bioreaktorsystem.....	139

8.3.4.4	Analyse der inneren Gefäßoberfläche des re-zellularisierten Gefäßes nach Kultivierung im Bioreaktor	140
8.3.5	Fluoreszenzfärbungen	141
8.3.5.1	Zellkernfärbung.....	141
8.3.5.2	Färbung des Zytoskeletts	141
8.3.5.3	Färbung der Zell-Zell-Kontakte durch Markierung von VE-Cadherin.....	141
8.3.6	Bioreaktor-Charakterisierung und Optimierung	142
8.3.6.1	Biorektoraufbau und Funktion	142
8.3.6.2	Aufbau des FIA-Systems zur sterilen Entnahme von Proben während der Kultivierung	143
8.3.6.3	Verwendete Test-Gefäßstrukturen	144
8.3.6.4	Erhöhung der Viskosität durch Zugabe von Methylcellulose und Viskositätsmessungen	145
8.3.6.5	Messung der Verweilzeitverteilung	146
8.3.6.6	Messung von Druck und Volumenstrom	146
8.3.6.7	Erzeugung exemplarischer Druckpulse	147
8.3.6.8	CFD-Simulation zur Abschätzung des Scherstress auf der inneren Gefäßoberfläche	148
	Betreute Abschlussarbeiten	150
	Abbildungsverzeichnis	151
	Tabellenverzeichnis.....	159
	Lebenslauf	160
	Publikationsliste	162

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis aller verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
μCT	Micro-Computertomographie
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AD-hMSC	hMSC aus dem Fettgewebe (engl.: <i>adipose-tissue derived hMSC</i>)
Ang1	Angiopoetin 1
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien (engl.: <i>advanced therapy medicinal product</i>)
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: <i>basic Fibroblast growth factor</i>)
CD	Unterscheidungsgruppe (engl.: <i>cluster of differentiation</i>)
CFD	Numerische Strömungsmechanik (engl.: <i>computational fluid dynamics</i>)
CTB	Zelltiter blau (engl.: <i>cell titer blue</i>)
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECFC	Endotheliale, koloniebildende Zelle (engl.: <i>endothelial colony forming cell</i>)
EGM-2	Endotheliales Wachstumsmedium 2 (engl.: <i>endothelial cell growth medium 2</i>)
FDM	Schmelzschichtverfahren (engl.: <i>fused deposition modeling</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
FpA	Fibrinopeptid A
FpB	Fibrinopeptid B
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1 (engl.: <i>Hypoxia induced factor 1</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
HS	Humanserum
HUVEC	Endothelzelle aus humanem Nabelschnurblut (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cell</i>)
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle (engl.: <i>mesenchymal stem cell</i>)

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MWCO	molekulargewichtsgrenzwert (engl.: <i>mass weight cut-off</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF- β	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten β (engl.: <i>Platelet derived growth factor β</i>)
PDO	Polydioxan
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglycolsäure
PLGA	Polylactid-co-Glycolid (engl.: <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PLLA	Polymilchsäure (engl.: <i>poly-L-lactic acid</i>)
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>quantative real-time polymerase chain reaction</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SMC	Glatte Muskelzelle (engl.: <i>smooth muscle cell</i>)
VE-Cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin (engl.: <i>vascular endothelial cadherin</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World health Organization</i>)
α -MEM	<i>alpha Minimum Essential Medium</i>

Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Einheiten.

Einheit	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ A	Mikroampere
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer
AU	Willkürliche Einheit (engl.: <i>arbitrary units</i>)

Abkürzungsverzeichnis

bar	Bar
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dyn	Dyn
g	Gramm
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
L	Liter
m	Meter
M	Molar
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
ms	Millisekunde
N	Newton
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (engl.: <i>Relative fluorescence units</i>)
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>Rounds per minute</i>)
s	Sekunde
W	Watt
xg	x-fache Gewichtskraft

1 Einleitung

Der Tod durch kardiovaskuläre Erkrankungen, wie der ischämischen Herzkrankheit, welche aufgrund von Atherosklerose der koronaren oder peripheren Arterien z.B. zu Herzinfarkt oder plötzlichem Herztod führen können, ist laut der *World Health Organization* (WHO) mit 16% im Jahr 2019 immer noch die häufigste Mortalitäts-Ursache weltweit (WHO 2020). Neben genetischen Dispositionen sind Faktoren, wie eine alternde Gesellschaft, Essgewohnheiten, Rauchen und andere Lebensgewohnheiten Gründe für eine Steigerung der Anzahl der chirurgischen Eingriffe zur Behandlung vaskulärer Erkrankungen. Bei den chirurgischen Eingriffen, mit dem Ziel einen Verschluss zu beseitigen oder ein erweitertes Blutgefäß zu ersetzen, wird zwischen Gefäßen mit kleinem (z.B. bei den Koronararterien) und großem Durchmesser (z.B. bei den peripheren Arterien der Extremitäten) unterschieden. Der Goldstandard bei kleinen Gefäßen mit einem Durchmesser <6 mm ist die Verwendung von autologen Gefäßen und bei größeren Gefäßen mit einem Durchmesser >6 mm die Verwendung eines nicht-degradierenden synthetischen Polymers, wie ePTFE oder Dacron. Autologe Gefäße sind jedoch nicht immer verfügbar, entweder weil sie bereits in vorherigen chirurgischen Eingriffen verwendet worden sind oder weil sie aufgrund von Alterserscheinungen oder Krankheiten nicht geeignet sind. Synthetische Gefäßprothesen werden standardmäßig als Ersatz für Gefäße mit einem Durchmesser >6 mm verwendet. Sie haben jedoch eine schlechtere Durchlässigkeit als autologe Gefäße und sind bei kleineren Durchmessern anfällig für thrombotische Verschlüsse, wodurch ihre Implantation für den Empfängerpatienten mit der anhaltenden Einnahme von gerinnungshemmenden Medikamenten verbunden ist. Aufgrund dieser Nachteile besteht ein Bedarf an der Entwicklung einer Gefäßprothese, welche die Limitierungen der bisher verwendeten Substitute überwindet. Eine mittels *Tissue Engineering* hergestellte bioartifizielle Gefäßprothese unter Verwendung autologer Zellen und einem degradierbaren *Scaffold*, welche dazu in der Lage ist, sich vollständig in den Körper zu integrieren und sich weiter anzupassen, könnte die Lösung darstellen. Entscheidend für den Erfolg einer bioartifiziellen Gefäßprothese sind die Auswahl eines geeigneten *Scaffolds*, bzw. dessen Struktur, und die Verwendung geeigneter Zellen, um eine hohe Funktionalität zu gewährleisten. Für die Reifung des Gefäßes *in vitro* durch Konditionierung mit biophysikalischen Stimuli wird ebenfalls ein geeignetes Bioreaktorsystem benötigt, welches eine physiologische Umgebung erzeugt, die die hämodynamischen Bedingungen im menschlichen Körper abbildet. (Fioretta et al. 2020; Carrabba und Madeddu 2018; Pashneh-Tala et al. 2016)

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung von Strategien zur Herstellung und Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Das Projekt wurde hinsichtlich seiner technischen Realisierung in Kooperation mit dem Institut für Mikroelektronische Systeme der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese aus einem bioabbaubaren, synthetischen und einem natürlichen Polymer und der Besiedelung mit geeigneten Zellen könnte zukünftig eine neue Alternative zu autologen Gefäßprothesen bilden, welche nicht immer verfügbar sind, und die Nachteile bisher genutzter synthetischer Gefäßprothesen überwinden. Die Schritte zur Entwicklung und Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese werden in dieser Arbeit in vier Teilbereiche aufgegliedert: (1) Die Herstellung und Charakterisierung eines geeigneten biohybriden *Scaffolds* aus Polydioxanon, einem synthetischen Polymer, und Fibrin, einem natürlichen Polymer, (2) die Optimierung einer Methode zur Vaskularisierung eines künstlichen Gewebes mit Endothelzellen und mesenchymalen Stammzellen, (3) die Charakterisierung eines für die Kultivierung der bioartifiziellen Gefäßprothese geeigneten Bioreaktorsystems und (4) die Entwicklung einer Besiedelungs- und Kultivierungsstrategie für die bioartifizielle Gefäßprothese im zuvor charakterisierten Bioreaktorsystem einschließlich einer ersten Testkultivierung.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Bioartifizielle Gefäßprothesen

Im folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen, welche für die Entwicklung und Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese mittels *Tissue Engineering* entscheidend sind, erläutert. Zu diesem Zweck wird im ersten Abschnitt dieses Kapitels der Begriff *Tissue Engineering* definiert, es werden die Anforderungen an eine bioartifizielle Gefäßprothese definiert und nachfolgend die theoretischen Grundlagen über die Physiologie von Gefäßen dargestellt, welche für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese wichtig sind. Anschließend werden die für die Herstellung von künstlichem Gewebe mittels *Tissue Engineering* benötigten allgemeinen Voraussetzungen vermittelt und im Speziellen auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Zelltypen eingegangen. Abschließend werden verschiedene Methoden und Ansätze zur Herstellung eines künstlichen Gefäßes dargestellt und Strategien für die Kultivierung einer biohybriden Gefäßprothese in einem geeigneten Bioreaktorsystem aufgezeigt.

3.2 *Tissue Engineering*

Der Begriff *Tissue Engineering* bezeichnet ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches unter anderen die Forschung im Bereich Zellbiologie, Biomaterialentwicklung, Ingenieurwissenschaften und Medizin miteinander vereint. Das Ziel ist die Regenerierung oder der Ersatz von verletztem Gewebe auf Basis von autologen Zellen. Die Grundstrategie ist hierbei die Entnahme von Zellen aus einem Patienten und deren Expansion in Zellkultur. Die Zellen werden dann auf einer geeigneten synthetischen oder natürlichen Gerüststruktur (*Scaffold*) angesiedelt oder *Scaffold-free* als Sphäroide oder „*cell sheets*“ zu größeren Konstrukten zusammengelagert. Diese Konstrukte können entweder in speziell entwickelten Bioreaktorsystemen, zur Ausübung biophysikalischer Stimuli, *in vitro* vor der Implantation kultiviert werden oder direkt implantiert werden, wobei der Körper die Funktion des Bioreaktors *in vivo* übernimmt. Durch den Einsatz von *Tissue Engineering* könnte somit dem Mangel an Spenderorganen entgegengewirkt werden, aber auch die Nutzung von Versuchstieren reduziert und die Verlässlichkeit von Versuchsergebnissen verbessert werden. Dabei steht die Standardisierbarkeit von Herstellungsverfahren für *tissue engineered products* im Sinne eines gerichteten Verfahrens in der Bioprozesstechnik im Vordergrund. (O'Brien 2011; Jafari et al. 2017; Polak und Bishop 2006; Zhao et al. 2018; Ovsianikov et al. 2018)

3.3 Anforderungen an eine bioartifizielle Gefäßprothese

Eine bioartifizielle Gefäßprothese muss für die benötigte Funktionalität verschiedene Anforderungen erfüllen. In erster Linie ist entscheidend, dass die Gefäßprothese den hämodynamischen Bedingungen im menschlichen Körper standhält. Das bedeutet, dass die Gefäßprothese einen hohen Berstdruck (engl.: „burst pressure“) aufweist und somit dem physiologischen Druck standhält und nicht platzt oder es zu Aneurysmen kommt. Ebenfalls sollte die Gefäßprothese über eine geeignete Nachgiebigkeit (engl. *Compliance*) für die Vermeidung von zu hohem Scherstress und eine geeignete Geometrie, um unerwünschten Flusseigenschaften entgegenzuwirken, verfügen. Zu den weiteren Anforderungen an die Gefäßprothese zählt ein geringer Druckverlust über die Länge der Gefäßprothese, eine anti-thrombogene Wirkung auf der luminalen Seite der Gefäßprothese, die Verwendung eines nicht zytotoxischen Materials und die Vermeidung einer Immunreaktion sowie einer chronischen Entzündung. Aus klinischer Sicht sollte die Gefäßprothese mit einer Knick-Bruchresistenz und der Möglichkeit, das Gefäß zu vernähen, zur Implantation geeignet sein. Nach Implantation sollte die Gefäßprothese die Fähigkeit besitzen *in vivo* zu wachsen, sich anzupassen und durch aus dem Körper-„Reaktor“ herantretende Zellen repariert oder ergänzt werden zu können. Außerdem sollte die serielle Produktion der Gefäßprothese in gleichbleibender Qualität, mit variabler Länge, mit nachhaltiger Lagerung und geeignetem Transport unter andauernder geforderter Qualitätskontrolle möglich sein. (Baguneid et al. 2006; Chlupáč et al. 2009; Pashneh-Tala et al. 2016; Weinberg und Bell 1986)

3.4 Aufbau und Bedeutung des Gefäßsystems und der verschiedenen Blutgefäßtypen

Im menschlichen Herz-Kreislauf-System wird das Blut zum Transport von Sauerstoff und Nährstoffen durch verschiedene Gefäße transportiert (siehe Abbildung 1). Zu den verschiedenen Gefäßtypen zählen die Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen. Das Blut wird vom Herzen aus mittels Arterien transportiert, diese Arterien verzweigen sich immer weiter in Arteriolen. Die Arteriolen sind mit noch kleineren Gefäßen verbunden, den Kapillaren. Durch Diffusion der Nährstoffe und des Sauerstoffs aus dem Blut durch die Gefäßwand dieser Kapillaren wird das umliegende Gewebe versorgt. Abfallstoffe werden in umgekehrter Richtung über die Gefäßwand in die Kapillaren transportiert. Aus den Kapillaren fließt das Blut zurück zu den Venolen, welche sie weiter zu Venen vereinigen und das Blut zurück zum Herzen transportieren. Der Blutdruck in größeren Arterien beträgt im Normalfall 120/80 mmHg. Ein Blutdruck von unter 90/60 mmHg wird als hypotonisch und ein Blutdruck

von 180/120 als schwer hypertonisch bezeichnet. (Jessica I. Gupta und Michael J. Shea 2019; Shahoud et al. 2021)

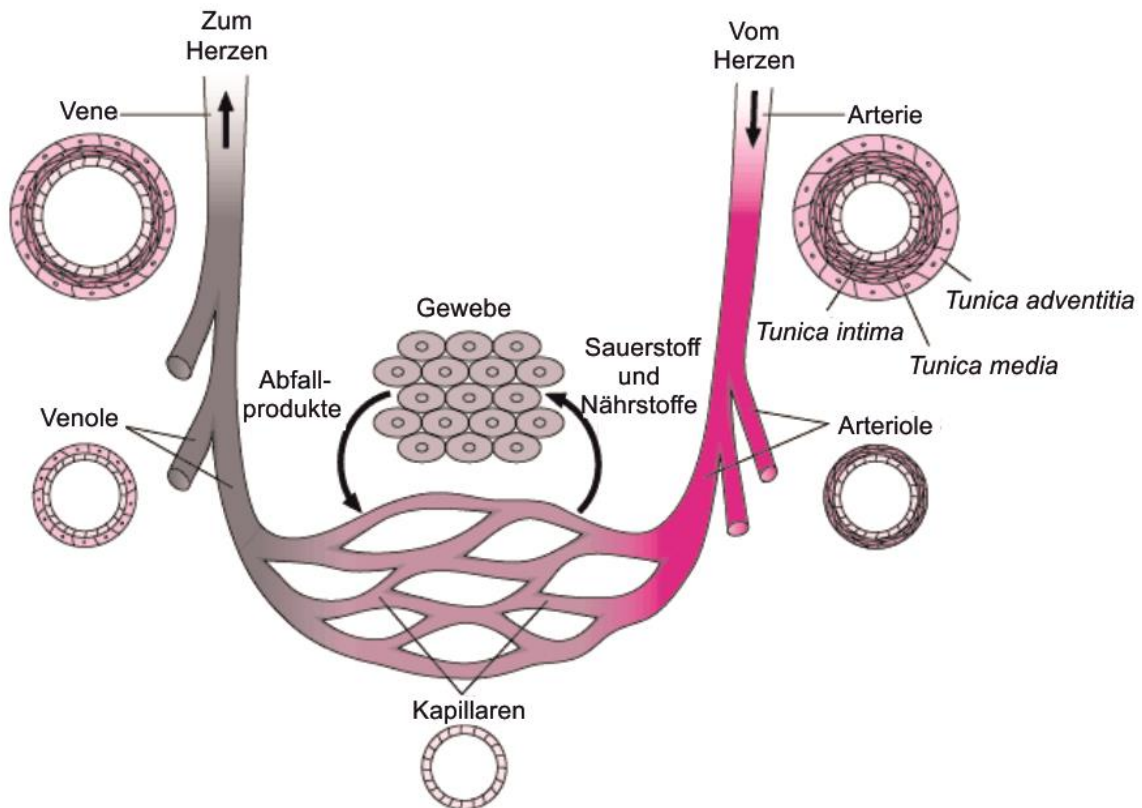


Abbildung 1: Aufbau des Gefäßsystems. Modifiziert nach (Jessica I. Gupta und Michael J. Shea 2019).

Die Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen sind grundsätzlich aus drei Schichten aufgebaut. Diese drei Schichten werden von der luminalen Seite nach außen hin *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* genannt. Der Aufbau einer Arterie ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt. Die *Tunica intima* bildet die dünnste Schicht. Sie besteht aus einer einzelnen Schicht aus Endothelzellen, welche stromlinienförmig auf einer Basallamina ausgerichtet sind. Unter dieser befindet sich ein elastisches Bindegewebe, welches Stabilität und Flexibilität für die Endothelzellen bietet. Die Endothelzellen sind untereinander mit funktionalen Molekülen, wie VE-Cadherin oder Claudinen, verbunden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebemhomöostase. Sie regeln den Gefäßtonus und sind in Thrombolyse und Koagulationsprozesse eingebunden. Die Oberfläche der Endothelzellen besteht aus einer Schicht Glykoproteine (Glykokalyx), welche eine lokal geladene Barriere zur transendothelialen Migration von Blutzellen und Plasmaproteinen bildet und metabolisch aktiv ist. Ebenfalls nahe der Endothelzellen sind perivaskuläre Zellen (Perizyten und glatte

Muskelzellen) lokalisiert. Perizyten entwickeln sich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen. (Pugsley und Tabrizchi 2000; Viallard und Larrivéé 2017)

Die *Tunica media* besteht primär aus *Smooth muscle cells* (SMCs) und Fasern aus Elastin und Kollagen. Die Dicke der *Tunica media* ist variabel. In Arterien, insbesondere großen Arterien, ist sie dicker. In größeren Gefäßen besteht die *Tunica media* zum größten Teil aus den elastischen Fasern. In kleineren Gefäßen steigt der Anteil an SMCs an. Zwischen *Tunica media* und *Tunica adventitia* befindet sich die *Membrana elastica externa*, eine elastische Membran, die mechanische Stabilität gibt. Die *Membrana elastica externa* kommt bei venösen Gefäßen nicht vor, diese bilden entsprechend auch das Niederdrucksystem des menschlichen Körpers. (Pugsley und Tabrizchi 2000; Encyclopædia Britannica - The blood vessels)

Die *Tunica adventitia* besteht aus fibroelastischem Bindegewebe. Im Bindegewebe befindet sich das *vasa vasorum*, da die Diffusion von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid durch die Gefäßwand in dieser Schicht limitiert ist. Das *vasa vasorum* besteht aus Kapillargefäßen, welche für die Versorgung der Gefäßwand sorgen. (Pugsley und Tabrizchi 2000; Encyclopædia Britannica - The blood vessels)

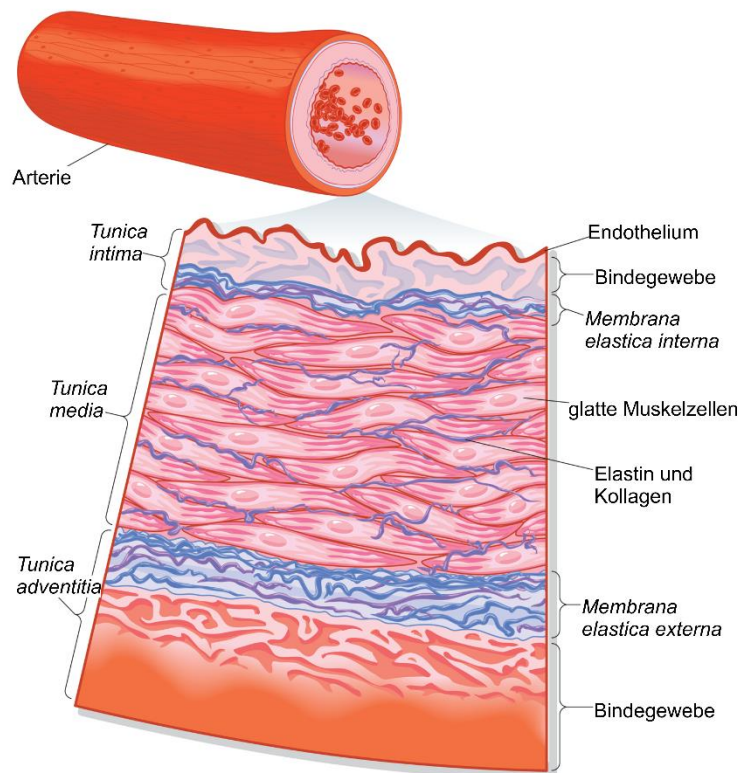


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand. Modifiziert nach (Encyclopædia Britannica - Transverse section of an artery).

Wie bereits ausgeführt, besteht die Funktion der kleinsten Gefäße, der Kapillaren, im Austausch von Flüssigkeiten, Nährstoffen, Sauerstoffen und Abfallstoffen mit dem umliegenden Gewebe. Die größten Kapillargefäße haben einen Durchmesser von 0,2 mm. Etwa ein Sechstel des gesamten Blutvolumens befindet sich in den Kapillargefäßen. Die Dichte des Kapillarnetzwerkes variiert je nach Gewebe. Die Wand von nicht-muskulären mikrovaskulären Gefäßen besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, Endothelzellen und Perizyten. Der Blutfluss in diesen Kapillaren wird primär durch die Kontraktion der Perizyten gesteuert. Die Gefäße selbst bilden eine Fortsetzung der inneren Schicht aus Endothelzellen aus den größeren Gefäßen mit einem durchschnittlichen Umfang von drei bis vier Endothelzellen. Der Umfang in Richtung der Venolen ist etwas weiter mit vier bis sechs Zellen. (Kelley et al. 1987; Encyclopædia Britannica - The blood vessels)

3.5 Physiologie der Vaskularisierung

Bei der natürlichen Bildung von einem Kapillarnetzwerk in neuem Gewebe kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Mechanismen unterschieden werden: Vaskulogenese und Angiogenese. Vaskuläres Wachstum während der Entwicklung, Regenerierung und auch innerhalb von Krankheiten umfasst die Aussprossung, Migration und Proliferation von Endothelzellen. Diese Vorgänge werden durch zahlreiche Faktoren reguliert. (Viallard und Larrivé 2017; Rouwkema und Khademhosseini 2016)

Vaskulogenese findet während der embryonalen Entwicklung statt und beschreibt den Vorgang einer *de novo* Bildung von Blutgefäßen. Hierbei differenzieren sich Angioblasten in Endothelzellen und proliferieren in einem zuvor nicht vaskulären Gewebe. Sie formen ein primitives vaskuläres Netzwerk. Vaskulogenese kann auch bei der Vaskularisierung von Gewebe nach schweren Verletzungen oder beim Tumorwachstum stattfinden. Bei dieser postnatalen Vaskulogenese werden endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn mobilisiert und durch *homing* an die defekte Gewebestelle gelenkt. Dort differenzieren sie in ausgereifte Endothelzellen und formen ebenfalls ein primitives vaskuläres Netzwerk. (Rouwkema und Khademhosseini 2016; Balaji et al. 2013; Risau und Flamme 1995)

Die meisten Prozesse bei der vaskulären Organisation und Umgestaltung sind angiogene Prozesse. Angiogenese ist definiert als die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen. Angiogenese findet bei erwachsenen Menschen nur sehr limitiert statt. Sie ist fast ausschließlich beschränkt auf Regenerierungsprozesse nach Verletzungen und Tumorwachstum. Beide Formen der Angiogenese werden von ähnlichen Signalen gesteuert, führen jedoch zu komplett unterschiedlichen Ergebnissen. Regenerative Angiogenese führt zur

Bildung von funktionalen und interkonnektiven Gefäßen, Tumor-induzierte Angiogenese führt zu einer hohen Anzahl unreifer und unorganisierter Gefäße. (Ziyad und Iruela-Arispe 2011; Mastrullo et al. 2020; Viallard und Larrivéé 2017)

Bei der Angiogenese werden ruhenden Endothelzellen eines existierenden Gefäßes durch eine ansteigende Konzentration von pro-angiogenen Faktoren aktiviert. Die pro-angiogenen Faktoren werden durch Entzündungs- oder Tumorzellen als Reaktion auf Verletzungen oder Hypoxie ausgeschüttet. Im Fall einer Hypoxie wird durch die niedrige O₂-Konzentration die Expression von *Hypoxia induced factor-1* (HIF-1) aktiviert. Die Expression von HIF-1 führt nachfolgend zur Bildung von u.a. *vascular endothelial growth factor* (VEGF) and *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Die Endothelzellen werden durch VEGF aktiviert und proliferieren und differenzieren sich in sogenannte *Tip*-Zellen und *Stalk*-Zellen (Abbildung 3). *Tip*-Zellen sind für die Verlängerung der neuen Gefäße in Richtung des Stimulus führt, *Stalk*-Zellen sorgen für die Verbindung mit dem ursprünglichen Gefäß. Die Regulation für die Bildung von *Tip*- oder *Stalk*-Zellen erfolgt über den *Notch*-Signalweg. Der *Notch*-Signalweg ist einer von wenigen Signalwegen, welche die Zelldifferenzierung, die Proliferation und den Zelltod regulieren. Die meisten Liganden sind Transmembranproteine, wodurch die Signalwirkung auf benachbarte Zellen begrenzt ist. Die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor induziert die Expression von delta-like 4 protein (Dll4), welches an Notch-Rezeptoren benachbarter Endothelzellen bindet. Dies unterdrückt die Expression des VEGF-Rezeptors und verstärkt die Proliferation der Endothelzellen. bFGF hat ebenfalls einen mitotischen Effekt auf die Endothelzellen, aber auch auf andere Zellen des Ektoderms und des Mesoderms, und ist ein starker *Inducer* der Angiogenese. Die *Tip*-Zellen bilden Filopodien zur Reaktion auf pro-angiogene Faktoren aus. Die Richtung der Migration der Zellen wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle bestimmt. Die Lumenbildung erfolgt durch die Bildung einer negativen Ladung an den Glykoproteinen auf der apikalen Seite der Endothelzellen. Diese negative Ladung führt zur Öffnung des Lumens und zu einer Verlagerung der Zell-Zell-Kontakte auf die Außenseite (Abbildung 4). Nach Bildung des Kapillargefäßes sekretieren die Endothelzellen Botenstoffe, wie *Platelet derived growth factor* β (PDGF- β) und Angiopoetin 1 (Ang1), zur Rekrutierung perivaskulärer Zellen, welche entlang des Gefäßes migrieren. PDGF-B wird besonders in den *Tip*-Zellen stark exprimiert. Die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen untereinander erfolgt durch die Bildung des Transmembran-Proteins VE-Cadherin, welches intrazellulär mit dem Zytoskelett und extrazellulär mit einem weiteren VE-Cadherin verbunden ist. (Mastrullo et al. 2020; Andrae et al. 2008; Strilić et al. 2009; Liu et al. 2013; Bremnes et al. 2006; Herbert und Stainier 2011; Bray 2006)

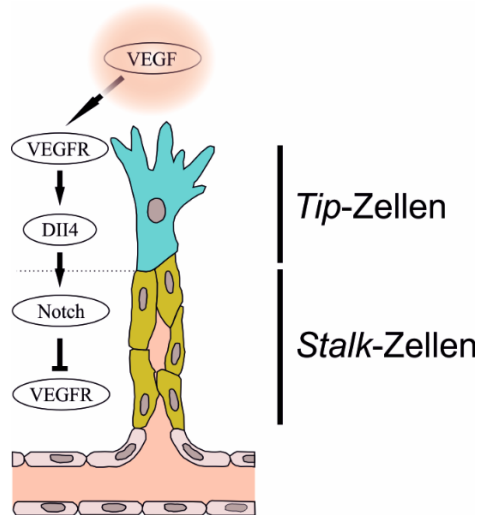


Abbildung 3: Ablauf der Angiogenese. Die Bindung von VEGF an die VEGF-Rezeptoren induziert die Expression von DII4 in *Tip*-Zellen (blau), welches an Notch-Rezeptoren benachbarter Endothelzellen bindet. Dies unterdrückt die Expression des VEGF-Rezeptors und verstärkt die Proliferation der Endothelzellen, welche als *Stalk*-Zellen (grün) die Basis für das neue Gefäß ausbilden. Modifiziert nach (Herbert und Stainier 2011).

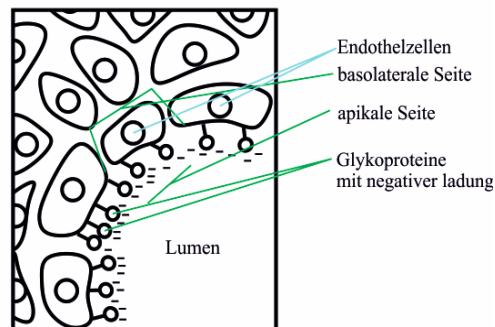


Abbildung 4: Ausbildung des Lumens in Kapillargefäßen. Das Lumen in den Kapillargefäßen erfolgt durch die Bildung einer negativen Ladung an den Glykoproteinen auf der apikalen Seite der Endothelzellen.

3.6 Herstellung eines Kapillargefäßsystems mittels *Tissue Engineering*

Da das Diffusionslimit von Sauerstoff erfordert, dass Zellen höchstens in einem Abstand von 100-200 μm zu einem Blutgefäß lokalisiert sein müssen, sind bei Geweben, wie auch bei größeren Blutgefäßen ab einem Durchmesser von 0,5 mm, wand- oder randständige Kapillargefäße erforderlich, um das Überleben dieser Zellen zu sichern. (Carmeliet und Jain 2000; Rouwkema und Khademhosseini 2016; Sun et al. 2016; Ritman und Lerman 2007).

Die durch *Tissue Engineering* hergestellte Gefäßstruktur sollte drei Anforderungen erfüllen: (1) Alle Zellen des Gewebes sollten nahe der gebildeten Gefäßstruktur liegen, um eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. (2) Das Lumen der Gefäße sollte mit einem funktionalen Endothelium für eine funktionierende Homöostase und einen kontrollierten Transport über die Gefäßwand ausgekleidet sein. (3) Die Gefäßstruktur sollte sich einfach in

die vorhandene Gefäßstruktur bei einer Implantation durch natürliche oder chirurgische Anastomosis integrieren lassen. (Yang et al. 2020)

Für die Integration eines Gefäßnetzwerks in ein durch *Tissue Engineering* hergestellten Konstrukt gibt es verschiedene Ansätze. Im folgenden Abschnitt werden einige grundsätzliche Ansätze zur Erzeugung eines Gefäßnetzwerkes dargestellt.

3.6.1 Natürliche Gefäßbildung durch spontane Selbstorganisation

Einige Ansätze beruhen auf der spontanen Selbstorganisation von Endothelzellen zur Bildung von Gefäßstrukturen in Analoga der extrazellulären Matrix oder in Zellaggregaten. In diesen Ansätzen wurde gezeigt, dass Endothelzellen ein primitives Netzwerk innerhalb des Gewebes formen können. Dies ist ein Prozess ähnlich der Vaskulogenese. Dieses Netzwerk kann sich in einem Prozess ähnlich der Angiogenese weiter ausbilden. Die finale Morphologie der Netzwerkstrukturen ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen und den anderen mit im Gewebe angesiedelten Zellen. Hierbei wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von muralen Vorläuferzellen, wie embryonalen Fibroblasten oder mesenchymalen Stammzellen, Fibroblasten und Perizyten zur Reifung der Netzwerkstrukturen beiträgt und die Gefäße stabilisiert. Diese Methode führt zu einer zufälligen Verteilung der Gefäße im künstlichen Gewebe. (Mastrullo et al. 2020; Levenberg et al. 2005; Rouwkema und Khademhosseini 2016; Sun et al. 2016)

3.6.2 Gefäßbildung anhand vorgefertigter Muster

Die Gefäßbildung anhand von vorgefertigten Mustern kann durch zwei verschiedene Methoden erfolgen. Entweder werden Kanäle in das genutzte *Scaffold* eingebaut oder die vaskulären Zellen werden bei der Besiedelung des *Scaffolds* zielgerichtet auf das *Scaffold* aufgebracht. Für die Herstellung vorgefertigter Kanäle im Konstrukt kann zum Beispiel mittels 3D-Druck ein zweites Strukturmaterial mitverarbeitet werden, welches in einem nachfolgenden Prozess herausgelöst wird, um die hohlen Kanäle herzustellen. Alternativ können z.B. Kanülen mit eingebracht und wieder entfernt werden. Die entstandenen Kanäle können für eine Versorgung des Gewebes perfundiert werden. Ebenfalls können diese Kanäle mit Endothelzellen besiedelt werden. Werden die Zellen zielgerichtet auf das *Scaffold* aufgebracht, kann Einfluss auf die Organisation der Netzwerkstrukturen genommen werden. Mit Hilfe von 3D-Druck kann somit ein Gewebe mit hoher Auflösung bei der Verteilung der Zellen und der extrazellulären Matrix aus dem Hydrogel hergestellt werden. Jedoch kann nicht die benötigte Auflösung für kleinste Kapillarstrukturen erreicht werden. (Mastrullo et al. 2020; Rouwkema und Khademhosseini 2016)

3.6.3 Gerichtete Gefäßbildung von Endothelzellen

Eine gerichtete Gefäßbildung kann ebenfalls durch die Herstellung lokaler Mikromilieus geschaffen werden. Hierbei wird versucht die Vaskularisierung durch die gezielte Einbringung von Wachstumsfaktoren oder chemischen Oberflächenmodifikationen oder durch die Veränderung der mechanischen Eigenschaften des *Scaffolds* zu steuern. Wachstumsfaktoren, wie VEGF, PDGF und Ang-1, können an die Oberfläche der *Scaffolds* gebunden werden und ermöglichen eine gezielte Freisetzung zur Steuerung der Angiogenese. Ebenso können gezielt Peptidsequenzen auf der Oberfläche der *Scaffolds* gebunden werden, welche zu einer Steigerung der Gefäßbildung führen. Alternativ kann die Angiogenese auch durch Veränderung der mechanischen Eigenschaften der *Scaffold*-Materialien beeinflusst werden. Die zellulären Reaktionen beruhen dabei auf der Spannung, welche die Zellen selbst durch Kontraktion auf die *Scaffold*-Matrix ausüben können. Hierbei wurde gezeigt, dass die gezielte Veränderung der Steifigkeit Anzahl und Länge von neuen Gefäßen beeinflussen kann. Somit kann ebenfalls durch Erstellung eines Gradienten eine gerichtete Angiogenese durchgeführt werden. (Rouwkema und Khademhosseini 2016; Mastrullo et al. 2020)

3.6.4 Zellsysteme für eine erfolgreiche Vaskularisierung von *Scaffolds*

Für die Umsetzung der in Abschnitt 3.6.1-3.6.3 dargestellten Ansätze zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerks in einem durch *Tissue Engineering* hergestellten Gewebekonstruktes können verschiedene Zellsysteme verwendet werden. In erster Linie sind Endothelzellen oder endotheliale Vorläuferzellen notwendig, welche die vaskulären Netzwerke bilden. Es konnte gezeigt werden, dass *Endothelzellen* in der Lage sind, in *Scaffolds* aus Komponenten der extrazellulären Matrix oder aus synthetischen Materialien, wie Poly-(ethylenglykol)-diacrylat (PEGDA), welches für bessere Zelladhäsion mit spezifischen Liganden (Arg-Gly-Asp-Ser) gekoppelt wurde, Netzwerkstrukturen auszubilden. Die nur durch Endothelzellen gebildeten Netzwerke sind allerdings nicht stabil. Aufgrund der Komplexität der Vaskularisierung *in vivo* ist dies jedoch nicht überraschend. Aus diesem Grund wurden in einer Vielzahl weiterer Ansätze zur Vaskularisierung Endothelzellen in Kombination mit anderen Zelltypen eingesetzt. In diesen Kokultivierungsansätzen wurden Endothelzellen in Kombination mit perivaskulären Zellen (*smooth muscle cells* (SMCs) oder Perizyten), mesenchymalen Stammzellen (MSCs) oder Fibroblasten kultiviert. In Kokultur mit Perizyten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten die Struktur und Funktion der Gefäße reguliert und die Perizyten die Gefäße stabilisieren. Bei der Kokultur von Endothelzellen und MSCs konnte gezeigt werden, dass MSCs sich wie murale Zellen verhalten und sich zu diesen differenzieren können sowie die Vaskularisierung durch Sekretion von Wachstumsfaktoren

unterstützen. Die Differenzierung zu muralen Zellen wird durch die zelluläre Kommunikation über die *gap junctions* zwischen Endothelzellen und MSCs ausgelöst. Murale Zellen umgeben die Blutgefäße und sind entscheidend für die Stabilität der Gefäße. Bei Kokulturen aus Fibroblasten und Endothelzellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese die Netzbildung der Endothelzellen durch Ausbildung der extrazellulären Matrix unterstützen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen (Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) und MSCs) sind in den folgenden beiden Abschnitten näher dargestellt. (Pill et al. 2015; Sun et al. 2016)

3.6.4.1 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Bei HUVECs handelt es sich um venöse Endothelzellen, die aus der Nabelschnur extrahiert werden. HUVECs sind als Modellzellen zur Untersuchung der Angiogenese und für die Vaskularisierung etabliert. In Zellkultur weisen HUVECs fast alle Eigenschaften nativer vaskulärer Endothelzellen auf. Sie exprimieren spezifische Endothelzellmarker wie von Willebrand Faktor ICAM-1, VCAM-1 und CD31 und verschiedene Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zytokine, Liganden sowie Signalwege für VEGF, FGF, TGF- β , TNF- α und Angiopoetin 2. Ebenso sind HUVECs sensitiv für physiologische und/oder pathologische Stimuli, wie Scherstress, hohe Glukosekonzentrationen und Lipopolysaccharide. Bei der Untersuchung der Angiogenese werden HUVECs häufig einzeln oder in Kokultur mit anderen Zelltypen eingesetzt. Ebenfalls werden HUVECs für die Vaskularisierung von Oberflächen aufgrund ihrer Sensitivität für Scherstress als Modellzellen verwendet, um den Einfluss von Scherstress auf die Bildung und Funktion des Endotheliums zu untersuchen. (Park et al. 2006; Cao et al. 2017; Medina-Leyte et al. 2020)

3.6.4.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Mesenchymale Stammzellen sind adulte Stammzellen, die in verschiedenen Geweben vorkommen. Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in der Lage sind, sich in vielfältige Zellen unterschiedlicher Gewebe zu differenzieren. MSCs können für das *Tissue Engineering* zum Beispiel aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe isoliert werden. Die Isolierung von einer ausreichenden Menge an MSCs aus kleinen Mengen Fettgewebe ist möglich, daher stellt das Fettgewebe eine attraktive Quelle für MSCs dar. Sie werden anhand verschiedener Kriterien definiert: Sie wachsen in Zellkultur adhärent, sie exprimieren Endoglin, CD73 und CD90 und exprimieren kein CD45, CD34, CD14 oder CD11, CD97 α oder CD19 und kein HLA-DR und sie besitzen das Potential zur Differenzierung, unter anderem in Osteozyten, Chondrozyten, Tenozyten und Adipozyten, aber auch zu muralen Zellen (Perizyten

und glatte Muskelzellen) und endothelialen Zellen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MSCs in der Lage sind, pro-angiogene Faktoren, wie VEGF, bFGF und Ang-1 zu exprimieren und anderen Stoffe, wie Stickstoffmonoxid, und somit die Angiogenese von endothelialen Zellen unterstützen. MSCs unterstützen die Netzbildung von Endothelzellen bei der Angiogenese auch durch die Stabilisierung der Netzwerkstrukturen und verhalten sich wie Perizyten, bzw. differenzieren sich im Verlauf der Gefäßbildung zu muralen Zellen. (Pill et al. 2015; Deans und Moseley 2000; Thoms 2019; Yang et al. 2020; Sun et al. 2016)

3.7 Funktion und Herstellung von *Scaffolds* im *Tissue Engineering*

Scaffolds sind die Grundlage für die Herstellung von künstlichem Gewebe im *Tissue Engineering*. Sie bilden die dreidimensionale Gerüststruktur für die Besiedelung mit Zellen und die Produktion der extrazellulären Matrix und schaffen eine optimale Umgebung für die Zellen. Zusätzlich können sie auch als Träger für Cytokine und Wachstumsfaktoren verwendet werden. (Jafari et al. 2017; O'Brien 2011; Zhao et al. 2018)

3.7.1 Anforderungen an *Scaffolds* im *Tissue Engineering*

Die *Scaffolds*, welche für das *Tissue Engineering* verwendet werden, müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Diese Anforderungen müssen bei der Entwicklung eines geeigneten *Scaffolds* berücksichtigt werden.

1. Biokompatibilität

Das wichtigste Kriterium für ein *Scaffold*-Material ist dessen Biokompatibilität. Das Material muss Zelladhäsion, Zellmigration und eine normale Funktion gewährleisten. Nach der Implantation des Konstruktes darf dieses nur eine geringfügige Immunantwort hervorrufen und keine schwere Entzündung, welche zu einer verminderten Heilung oder zu einer Abstoßung des Implantats führt. (O'Brien 2011; Dhandayuthapani et al. 2011)

2. Biodegradierbarkeit

Idealerweise sollte das *Scaffold* nach der Implantation degradieren und parallel durch körpereigene Zellen und neu produzierte extrazelluläre Matrix ersetzt werden. Dieses neu gebildete Gewebe soll somit die mechanische Stabilität des *Scaffolds* ersetzen. Die Degradationsrate kann durch die Auswahl eines geeigneten Materials und dessen Zusammensetzung variiert werden. Die Abbauprodukte der Degradation sollten nicht toxisch sein und durch den Körper ohne Interferenz mit anderen Organen abgeführt werden. (O'Brien 2011; Coenen et al. 2018; Dhandayuthapani et al. 2011; Zhang et al. 2014a)

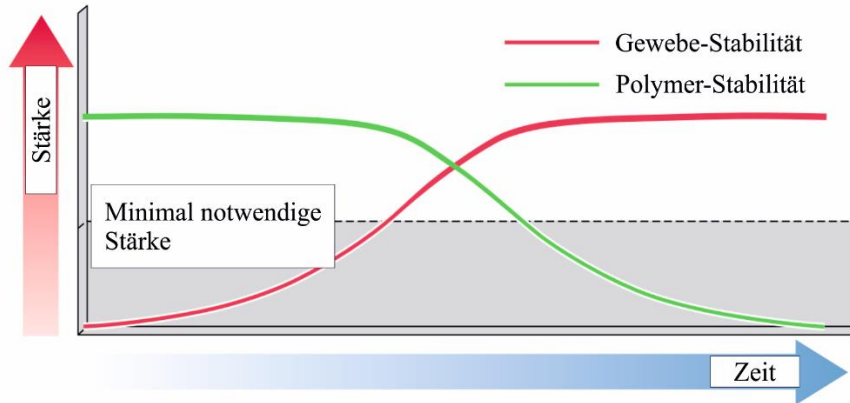


Abbildung 5: Scaffold-Degradation und Geweberegeneration. Nach der Herstellung des Gewebekonstruktes wird der Großteil der mechanischen Stabilität durch das Polymer-Scaffold getragen. Durch die Reifung des Gewebes nimmt dessen mechanische Stabilität zu und das Gewebe übernimmt die Funktion des Polymers. Modifiziert nach van Lith und Ameer (van Lith und Ameer 2011).

3. Mechanische Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften des *Scaffolds*, wie Bruchstärke und Elastizität, sind ein wichtiger Faktor bei der Auswahl eines geeigneten Materials. Die mechanischen Eigenschaften des *Scaffolds* sollten für eine optionale Funktionalität den Eigenschaften des Zielgewebes entsprechen. Ebenso wirken sie sich direkt auf das Verhalten der Zellen aus und beeinflussen dieses. Zusätzlich sollten die mechanischen Eigenschaften des *Scaffolds* eine chirurgische Handhabung ermöglichen. (Mastrullo et al. 2020; O'Brien 2011; Dhandayuthapani et al. 2011)

4. Scaffold-Aufbau

Der Aufbau des *Scaffolds* ist entscheidend für eine optimale Funktionalität von diesem. Die Struktur des *Scaffolds* sollte eine interkonnektive Porenstruktur mit einer hohen Porosität aufweisen, damit Zellen in das Scaffold eindringen können und ein Transport von Nährstoffen und Abfall- und Abbauprodukten stattfinden kann. Der Porendurchmesser ist ebenso entscheidend, da Zellen mit der Scaffold-Oberfläche durch chemische Gruppen (Liganden) auf der Oberfläche interagieren. Natürliche Materialien der extrazellulären Matrix, welche als *Scaffolds* verwendet werden, besitzen diese Liganden zum Beispiel als Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz. Auf synthetischen *Scaffolds* müssen diese Liganden eventuell durch Protein-Adsorption auf der Oberfläche gebunden werden. Somit ist die Porengröße entscheidend, da diese die spezifische Oberfläche des *Scaffolds* und somit die Dichte der Liganden bestimmt. (O'Brien 2011; Zhao et al. 2018; Dhandayuthapani et al. 2011)

5. Herstellungsprozess

Neben der Biokompatibilität, der Degradation, den mechanischen Eigenschaften und dem *Scaffold*-Aufbau ist die Herstellungsmethode ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung eines *Scaffolds*. Die Herstellung eines *Scaffolds* unter Berücksichtigung der Kosteneffizienz und der Skalierbarkeit nach oben sowie GMP-Standards ist entscheidend für die klinische Translation. Hierfür ist ebenso wichtig, wie das Produkt für den klinischen Einsatz verfügbar ist. Ein Produkt welches direkt verfügbar ist, wäre einem Produkt, welches die vorherige Entnahme und in vitro Kultivierung von Zellen erfordert, vorzuziehen, jedoch ist dies nicht für alle Gewebetypen möglich und aus diesem Grund oft notwendig. (O'Brien 2011; Hollister 2009)

3.7.2 Materialien für *Scaffolds* im *Tissue Engineering*

Für die Herstellung von *Scaffolds* kann eine Vielzahl von verschiedenen Materialien verwendet werden. Diese Materialien werden als Biomaterialien bezeichnet. Dabei ist der Begriff Biomaterial von der *European Society for Biomaterials Consensus Conference II* definiert als Material, welches dazu gedacht ist in Interaktion mit biologischen Systemen Gewebe, Organe und andere Funktionen des Körpers zu evaluieren, behandeln, augmentieren oder zu ersetzen. Üblicherweise werden für die Herstellung von *Scaffolds* drei verschiedene Kategorien von Biomaterialien verwendet: Synthetische Polymere, natürliche Polymere und Keramiken. Die Auswahl des geeigneten *Scaffold*-Materials basiert auf den chemischen Eigenschaften des Materials, dem Molekulargewicht, der Löslichkeit, der Form und Struktur, der Hydrophilizität/Hydrophobizität, der Schlüpfrigkeit, der Oberflächenenergie, der Wasserabsorption und der Degradation und Erosion des Materials. (O'Brien 2011; Merolli und Joyce 2009; Dhandayuthapani et al. 2011)

3.7.2.1 Keramiken

Scaffolds, welche aus Keramiken hergestellt werden, zeichnen sich meistens durch eine hohe Steifigkeit, sehr niedrige Elastizität, hohe Sprödigkeit, thermische und elektrische Isolation und Korrosionsbeständigkeit aus. Die verwendeten Keramiken können entweder als bioinert oder bioaktiv eingeteilt werden, wobei bioaktive Keramiken sich noch weiter in degradierbare oder nicht-degradierbare Keramiken unterteilen lassen. Zu den bioinerten Keramiken zählen zum Beispiel Keramiken auf Basis von Aluminiumoxid oder Zirkoniumoxid. Aluminiumoxid und Zirkoniumoxid weisen eine gute Biokompatibilität und mechanische Stärke auf, zeigen aber aufgrund der Inertie keine Bindung mit dem umliegenden Gewebe. Bei bioaktiven Keramiken ist die chemische Reaktivität im Gegensatz dazu entscheidend. Zu den bioaktiven Keramiken zählen unter anderem Kalziumphosphat-Keramiken, bioaktive Glase oder Glas-Keramiken. Die

am meisten genutzte Kalziumphosphat-Keramik ist Hydroxyapatit aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu den anorganischen Bestandteilen von Knochen und Zähnen. (Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers 2014; O'Brien 2011)

3.7.2.2 Synthetische Polymere

Es gibt eine Vielzahl an synthetischen Polymeren, welche für die Herstellung von *Scaffolds* verwendet werden. Zu diesen zählen unter anderem Polystyrol, Polyethylenglykol (PEG), Polylactid (PLA), Polyhydroxyessigsäure (PGA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA) und Polydioxanon. Diese synthetischen Polymere bieten den Vorteil, dass ihre Struktur und Degradationseigenschaften durch die Auswahl des Polymers und dessen individuelle Zusammensetzung variiert werden können. Je nach Anteil der Copolymere kann z.B. die Halbwertszeit von PLGA zwischen drei und zwanzig Wochen variieren. Ebenso kann die Konfiguration der Polymerketten Auswirkungen auf die Degradationszeit haben. Für Poly-(L-Lactid) beträgt die Halbwertszeit bis zu 110 Wochen, wohingegen sie für Poly-(DL-Lactid) nur bei zehn Wochen liegt. Im Vergleich zu natürlichen Polymeren verfügen sie nur über eine reduzierte Bioaktivität, dieses Problem kann jedoch durch die Nachahmung biologischer Signale der extrazellulären Matrix auf der *Scaffold*-Oberfläche überwunden werden. (O'Brien 2011; Lutolf und Hubbell 2005; Boland et al. 2005; Jafari et al. 2017; Zhang et al. 2014a)

3.7.2.3 Natürliche Polymere

Ebenso, wie eine Vielzahl an synthetischen Polymeren für die Herstellung von *Scaffolds* verwendet wird, werden natürliche Polymere verwendet. Zu den verwendeten natürlichen Polymeren zählen zum Beispiel Kollagen, Chitosan, verschiedene Proteoglykane, Alginat-basierte Substrate und Fibrin. Diese bieten den Vorteil, dass sie bioaktiv sind und z.B. durch die Präsentation von Rezeptor-bindenden Liganden typischerweise die Zelladhäsion und das Zellwachstum fördern. Sie können durch proteolytische Reaktion der Zellen ab- und umgebaut werden und ermöglichen den Zellen die Ausbildung einer eigenen extrazellulären Matrix, welche das *Scaffold* langfristig ersetzt. Nachteilig ist wiederum, dass es schwierig sein kann *Scaffolds* mit homogenen Eigenschaften reproduzierbar herzustellen. Ebenso verfügen sie meistens nur über schwache mechanische Eigenschaften, wodurch ihr Einsatzgebiet reduziert ist. Gleichzeitig ist die Aufreinigung der natürlichen Polymere komplex und es kann zu Problemen durch ihre Immunogenität oder die Übertragung von Pathogenen kommen. (O'Brien 2011; Lutolf und Hubbell 2005; Robinson et al. 2017)

Jede dieser Kategorien bietet zahlreiche Vor- aber auch Nachteile, daher nimmt der Anteil an Kompositen, welche die Vorteile einzelner Materialien miteinander vereinen, in den

verschiedenen Ansätzen zur Verwendung zu. Durch die Verwendung dieser hybriden *Scaffolds* können zum Beispiel die mechanische Stabilität, Anpassungsmöglichkeiten und Herstellungsmöglichkeiten für *Scaffolds* aus synthetischen Polymeren mit der Biokompatibilität von natürlichen Polymeren verbunden werden. (O'Brien 2011; Coenen et al. 2018; Pashneh-Tala et al. 2016; Chen und Kawazoe 2016)

In den folgenden beiden Absätzen wird im Detail auf die in dieser Arbeit verwendeten Materialien für die *Scaffold*-Herstellung, Polydioxanon (PDO) und Fibrin, eingegangen.

3.7.3 Polydioxanon

PDO ist ein farbloses, kristallines, biodegradierbares Polymer. PDO wird aus dem Monomer Paradioxonon durch eine ringöffnende Polymerisation unter Hitze und einem organometallischen Katalysator hergestellt. PDO hat einen kristallinen Anteil von 55% und eine Glasübergangstemperatur zwischen -10 °C und 0 °C . Die Degradation erfolgt durch Hydrolyse, innerhalb von zwei Monaten verliert das PDO die Struktur und wird innerhalb von sechs Monaten vollständig abgebaut. Die Abbauprodukte Glyoxylat und Glycin werden entweder über den Urin ausgeschieden oder im Citratzyklus zu Wasser und Kohlenstoffdioxid weiter abgebaut. Im Körper treten innerhalb von 15 Tagen bis zu einem Monat leichte bis moderate und nach drei und sechs Monaten nur noch leichte Entzündungsreaktion auf. Am häufigsten wird PDO als Monofilament in der kardiovaskulären Chirurgie verwendet. Bei dieser Nutzung als Monofilament verliert das Material innerhalb von drei Wochen 50% der Bruchfestigkeit. PDO verfügt über ein Formgedächtnis, dies kann bei Knotenbindung zu Problemen führen. Um Depolymerisation zu vermeiden, muss PDO bei möglichst niedrigen Temperaturen verarbeitet werden. PDO wurde außerdem bereits in der Orthopädie, der plastischen Chirurgie, als Träger bei der Verabreichung von Wirkstoffen, für kardiovaskuläre Anwendungen und bei der Reparatur von Knochen verwendet. (Boland et al. 2005; Ray et al. 1981; Garg et al. 2013; Pillai und Sharma 2010; Molea et al. 2000)

3.7.4 Fibrin

Fibrin entsteht durch die Spaltung des Glykoproteins Fibrinogen. Fibrinogen hat eine Größe von 340 kDa. Das Protein ist löslich und kommt in menschlichem Blut in einer Konzentration zwischen 1,5 g/L-4 g/L vor. Es ist essentiell für die Hämostase, Wundheilung, Entzündungen, Angiogenese und andere biologische Funktionen. Wenn Fibrinogen durch die Serin-Protease Thrombin geschnitten wird, bildet sich ein unlösliches Gerinnsel. Dieser Vorgang wird als Reaktion auf die Verletzung eines Blutgefäßes, aktivierte Blutzellen oder eine fremde Oberfläche durch eine Kaskade enzymatischer Reaktionen in Gang gesetzt. Fibrinogen besteht

aus drei verschiedenen Paaren von Peptidketten (Untereinheiten), $A\alpha$, $B\beta$ und γ , mit unterschiedlicher molekularer Masse von 66,5 kDa, 52 kDa und 46,5 kDa. Zusammen mit co- und posttranslational verlinkten Kohlenhydraten der $B\beta$ - und γ -Ketten ergibt sich die Gesamtmasse von 340 kDa. Die Polymerisation von Fibrin wird durch das Abschneiden der Fibrinopeptide A und B (FpA und FpB) durch Thrombin von den N-terminalen Teilen der $A\alpha$ - und $B\beta$ -Ketten zu einem Fibrin-Monomer gestartet. Anschließend lagern sich die Monomere spontan zu Oligomeren zusammen, welche sich zu zweisträngigen Protofibrillen verlängern. Die Protofibrillen verbinden sich lateral und longitudinal und formen somit verzweigte Fasern, die ein dreidimensionales geliertes Netzwerk bilden. Das Fibrin-Polymer wird anschließend durch die Plasmatransglutaminase Faktor XIIIa durch Ausbildung kovalenter Bindungen stabilisiert. Die physikalischen Eigenschaften des Fibrinnetzwerks ähneln denen von Weichgewebe. Die mechanischen Parameter können durch Variation der Konzentration von Fibrinogen, Thrombin und Faktor XIIIa angepasst werden. (Weisel und Litvinov 2017; Robinson et al. 2017; Maat und Verschuur 2005)

3.7.5 Herstellungsmethoden für *Scaffolds* im *Tissue Engineering*

Für die Herstellung von dreidimensionalen *Scaffolds* können verschiedene Methoden, auch in Kombination miteinander, verwendet werden. Häufig genutzte Verfahren sind 3D-Druck, das Gießen von Lösungen mit anschließender Partikel-Laugung, Elektrosponnen, thermisch induzierte Phasentrennung und Gefriertrocknung. (Zhao et al. 2018)

In den beiden folgenden Abschnitten wird auf die beiden Herstellungsmethoden, welche in dieser Arbeit für die Herstellung von *Scaffolds* verwendet wurden, 3D-Druck und Partikel-Laugung, im Detail eingegangen.

3.7.5.1 Scaffold-Herstellung mittels 3D-Druck

Bei 3D-Druck handelt es sich um eine additive Fertigungsmethode. Bei dieser Fertigungsmethode werden Materialien schichtweise aufeinander aufgebaut. Die Fertigung erfolgt anhand einer zuvor am Computer erstellten Geometrie (*computer aided design* (CAD)). Diese Geometrie kann zum Beispiel auf Basis von Computertomographie- oder Magnetresonanztomographieaufnahmen erstellt werden. Diese 3D-Geometrie wird für die Fertigung in einzelne 2D-Schichten zerlegt, welche dann Schicht für Schicht gedruckt werden. Auf diese Art können somit komplexe *Scaffolds* auf Mikro- und Makroebene in einem kostengünstigen Prozess aufgebaut werden. Bei den unterschiedlichen 3D-Drucktechniken kann zwischen dem Drucken von zellgeladenen Materialien (*bioprinting*) mittels Laser-gestütztem Drucken, extrusionsbasiertem Drucken und Tintenstrahldruck sowie dem Druck

von zellenlosen Materialien durch extrusionsbasiertem Drucken, selektivem Laserschmelzen und Stereolithographie unterschieden werden. Bei dem extrusionsbasierten Drucken von zellenlosen Materialien, wie zum Beispiel synthetischen Polymeren, wird das Material, entweder als Filament oder in Form von Pellets, geschmolzen und über eine Schnecke oder Druckluft durch eine Düse am Druckkopf extrudiert (Schmelzschichtverfahren, engl.: *fused deposition modeling*; FDM). Bei diesem Prozess sind die Parameter Temperatur, Druck, Schichthöhe und die Geschwindigkeit mit der sich der Druckkopf bewegt, entscheidend für das Resultat. (Zhao et al. 2018; Turnbull et al. 2018)

3.7.5.2 Scaffold-Herstellung mittels Partikel-Laugung

Die Herstellung von *Scaffolds* durch einen Partikel-Laugungsprozess basiert auf dem Lösen eines Polymers, aus welchem das spätere *Scaffold* besteht, in einem flüchtigen Lösungsmittel. Diese Lösung wird zusammen mit einem organischen Bestandteil oder wasserlöslichen Salzen in eine Form gegossen. Nach dem Verdunsten des flüchtigen Lösungsmittels entsteht ein Komposit aus Polymer und Partikeln. In einem weiteren Schritt werden die Partikel aus dem Komposit durch ein weiteres Lösungsmittel, z.B. Wasser, herausgelöst. Durch Variation der Geometrie der Gussform und der Eigenschaften der Partikel kann das entstehende *Scaffold* hinsichtlich Geometrie, Porengröße, Porengeometrie, Porenverteilung und Interkonnektivität angepasst werden. (Zhao et al. 2018; Turnbull et al. 2018; Tomlins 2016)

3.8 Bioreaktoren im Tissue Engineering

Die Herstellung eines funktionalen Gewebes *in vitro* erfordert eine genau definierte Kombination aus biochemischen, biophysikalischen und mechanischen Stimuli. Bioreaktoren werden im *Tissue Engineering* zur Kultivierung mit Zellen besiedelter *Scaffolds* und zur Ausübung biophysikalischer Stimuli währenddessen verwendet, um *in vitro* eine kontrollierte, native Mikroumgebung nachzuahmen. Die Stimuli dienen dazu, die Zellen, welche die Signale durch spannungssensitive Integrine zwischen extrazellulärer Matrix und Zelle, Ionen-Kanäle oder verschiedene Proteine auf Zell-Zell-Ebene wahrnehmen, in gewünschter Art und Weise zu beeinflussen. Bioreaktoren erfüllen mindestens eins der folgenden Kriterien: (1) Sie garantieren eine gleichmäßige Zellverteilung, (2) sie erhalten eine festgelegte Konzentration an Gasen und Nährstoffen im Zellkulturmedium, (3) sie verursachen einen Massentransport zu dem Gewebe, (4) sie üben biophysikalische Stimuli auf das Gewebe aus oder (5) sie stellen Informationen über das wachsende Gewebe zur Verfügung. Alle Materialien die für die Konstruktion eines Bioreaktors verwendet werden und die in Kontakt mit dem Zellkulturmedium oder dem Gewebe stehen, müssen bioinert oder biokompatibel sein. Ebenso

muss der Bioreaktor sterilisierbar sein. Die verschiedenen Bioreaktortypen können anhand der Art, wie die Zellen stimuliert werden, klassifiziert werden. Zu den typischen Bioreaktortypen, welche im *Tissue Engineering* genutzt werden, zählen: Spinnerflaschen-Bioreaktoren, in welchen das Medium unterhalb der *Scaffolds* gerührt wird, um einen erhöhten Massentransport in das Zentrum des *Scaffolds* zu erreichen, Bioreaktoren mit rotierender Wand, welche ebenfalls für einen erhöhten Massentransport im *Scaffolds* sorgen und gleichzeitig eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen verursachen, Kompressionsbioreaktoren, mit denen eine konstante oder dynamische Last auf das *Scaffold* ausgeübt werden kann, Bioreaktoren, welche Spannung auf das *Scaffold* ausüben, Bioreaktoren, welche hydrodynamischen Druck auf das *Scaffold* ausüben und Durchflussbioreaktoren, in welchen die *Scaffolds* einem konstanten oder dynamischen Fluidfluss ausgesetzt sind. Die verschiedenen Typen können auch miteinander kombiniert werden. (O'Brien 2011; Plunkett und O'Brien 2011; Bayir et al. 2020)

3.9 Gefäßprothesen

Gefäßprothesen zur Behandlung von vaskulären Erkrankungen werden in der Gefäßchirurgie seit den 1960er Jahren eingesetzt. Sie werden benötigt, wenn das umliegende Gewebe durch das Gefäß nicht oder nicht ausreichend mit sauerstoffhaltigem Blut versorgt werden kann. Die mangelnde Versorgung des Gewebes kann zu einer Ischämie, Hypoplasie und/oder Nekrose, je nach Grad der Unterversorgung, führen. Gefäßprothesen können in zwei Kategorien eingeteilt werden, Bioprothesen und synthetische Prothesen. Zu den Bioprothesen zählen autologe, homologe und heterologe Gefäße und zu den synthetischen Gefäßprothesen zählen Prothesen, welche aus synthetischen Materialien gefertigt werden oder durch *Tissue Engineering* hergestellt werden. (Walpoth et al. 2020)

3.9.1 Bioprothesen

Als Bioprothese werden Gefäßprothesen aus autologer, homologer oder heterologer Quelle bezeichnet. Gefäße aus autologer Quelle sind die erste Wahl, wenn sie verfügbar sind. Die Verfügbarkeit kann aber durch Erkrankungen der möglichen Gefäße, welche normalerweise verwendet werden, eingeschränkt sein. Die Verwendung von autologen Gefäßen ist allerdings auf kleine bis mittelgroße Gefäße (<10 mm) beschränkt. In den meisten Fällen, werden Venen, zum Beispiel die *Vena saphena magna* aufgrund der einfachen Zugänglichkeit, als Prothesen verwendet. Autologe Gefäßprothesen haben eine gute Langzeitdurchlässigkeit und ein niedrigeres Risiko für Infektionen und kurzfristig ein niedriges Risiko für thromboembolische Ereignisse im Vergleich zu den klassischen synthetischen Gefäßprothesen. Homologe Gefäße wurden bis zum Aufkommen von synthetischen Gefäßprothesen regelmäßig verwendet.

Heutzutage werden nur noch in Ausnahmen homologe arterielle Gefäße verwendet. Bei heterologen Gefäßprothesen konnte im Vergleich zu synthetischen Gefäßen noch kein Vorteil festgestellt werden. Es kann zu Reaktionen durch das Immunsystem aufgrund von Antigenen kommen, welche zur Degeneration, zu Thrombose oder zu einem Riss der Prothese führen können. Bei der Therapie von angeborenen Herzkrankheiten wird die Drosselvene von Rindern (Contegra®) häufig als Prothese verwendet. (Walpoth et al. 2020)

3.9.2 Synthetische Gefäßprothesen

Standardmäßig werden für synthetische Gefäßprothesen Materialien, wie Polyethylenterephthalat (PET) und expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE) verwendet. Prothesen aus PET (Terylene®, Dacron®) werden primär als Ersatz für Gefäße mit großem Durchmesser verwendet, wohingegen Prothesen aus ePTFE (Gore-Tex®, Teflon®) vorwiegend als Ersatz von kleinen und mittleren Gefäßen verwendet werden. In Metaanalysen konnte allerdings kein signifikanter Vorteil durch das eine oder andere Material nachgewiesen werden. Die Langzeitstabilität dieser synthetischen Gefäße, als Ersatz von Arterien mit einem Durchmesser >8 mm, liegt bei ca. 90%. Sie ist für mittlere arterielle Gefäßprothesen zwischen 6-8 mm ebenfalls zufriedenstellend. Bei kleineren Gefäßen unterhalb von 6 mm liegt die Langzeitstabilität jedoch deutlich unter der von autologen Gefäßen. Bei einem koronaren Bypass liegt die Rate nach einem Jahr für ePTFE-Prothesen bei ca. 60%, im Vergleich dazu bei der Verwendung der *Vena saphena magna* bei über 95%. Nach zwei Jahren liegt sie für ePTFE nur noch bei 32% und für die *Vena saphena magna* bei über 90%. Aus diesem Grund sind autologe Gefäße, wenn verfügbar, den herkömmlichen synthetischen Gefäßen vorzuziehen. Durch das Besiedeln der luminalen Seite der Gefäßprothese mit Endothelzellen konnten Fortschritte erzielt werden, die Ergebnisse liegen jedoch immer noch unter denen von autologen Gefäßen. (Walpoth et al. 2020; Pashneh-Tala et al. 2016)

Die häufigsten Gründe für das Ausfallen eines Gefäßes sind Thrombosebildung, eine intimale Hyperplasie, Atherosklerose oder eine Infektion. Kurz gesagt: Eine Thrombose kann durch eine Verletzung der Endothelschicht und die darauffolgende Ablagerung von Proteinen ausgelöst werden. Die intimale Hyperplasie kann durch die Einwanderung von SMCs in die Gefäßwand aufgrund einer Verletzung während der Transplantation oder durch nicht übereinstimmende Parameter zwischen natürlichem Gefäß und Gefäßprothese (Durchmesser und *Compliance*) auftreten. Atherosklerose kann wie bei natürlichen Gefäßen durch die Einwanderung von Monozyten auftreten. Eine bakterielle Infektion kann bei synthetischen Gefäßen aufgrund der

Anfälligkeit für eine bakterielle Besiedelung einfacher erfolgen als bei natürlichen Gefäßen. (Pashneh-Tala et al. 2016)

Aufgrund der eventuell nicht gegebenen Verfügbarkeit von autologen Gefäßen und den Limitierungen von aktuell verfügbaren Gefäßprothesen, könnte eine durch *Tissue Engineering* hergestellte bioartifizielle Gefäßprothese großes Potential besitzen, die Probleme zu überwinden.

3.9.3 Bioartifizielle Gefäßprothesen

Das Konzept einer bioartifiziellen Gefäßprothese schließt die Fähigkeit einer solchen Gefäßprothese zum Wachstum, zur Selbstreparatur, zur Anpassung und zur Reaktion auf die Umgebung ein. Für die Herstellung von bioartifiziellen Gefäßprothesen durch *Tissue Engineering* gibt es verschiedene Ansätze: *Scaffold*-basierte Ansätze, *Scaffold*-freie Ansätze und Ansätze, die auf einer dezellularisierten natürlichen Matrix basieren. Der erste Schritt involviert bei beiden Ansätzen die Extraktion von Zellen aus dem Patienten und die Expansion dieser *in vitro*. Bei *Scaffold*-basierten Ansätzen werden die Zellen im nächsten Schritt dann entweder auf ein tubuläres synthetisches, ein natürliches oder ein hybriden *Scaffold* angesiedelt oder mit einem *Scaffold*-bildenden Material vermischt und in eine tubuläre Form gebracht. Das besiedelte *Scaffold* wird dann zur Reifung in einem Bioreaktor kultiviert. Bei der Verwendung von dezellularisierten Matrizen aus heterologer Quelle als Basis für die Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese muss das entnommene Gewebe zuerst durch den Einsatz unterschiedlicher chemischer Substanzen von potentiellen Immunogenen befreit werden. Das dezellularisierte Gewebe wird dann, wenn es sich nicht bereits um ein dezellularisiertes Gefäß handelt, in eine tubuläre Form gebracht und mit Zellen besiedelt. Die Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese in einem *Scaffold*-freien Ansatz beruht auf der Zusammenlagerung von Zellen ohne die Hilfe einer Gerüststruktur. Hierfür werden entweder *cell sheets* hergestellt und dann in Schichten übereinander gelegt, um eine tubuläre Form zu erstellen oder es werden Mikroaggregate aus Zellen hergestellt und in einer Form zu einem Tubus zusammengefügt oder durch *Bioprinting* in diese Form gebracht. Die Stabilität der Konstrukte beruht auf der Bildung einer stabilen extrazellulären Matrix. (Pashneh-Tala et al. 2016; Chlupáč et al. 2009)

3.9.4 Konditionierung von biohybriden Gefäßstrukturen im geeigneten Bioreaktorsystem

Die abschließende Reifung einer *in vitro* hergestellten bioartifiziellen Gefäßprothese erfolgt typischerweise in einem speziell für diesen Zweck entwickelten Bioreaktorsystem.

Verschiedene entwickelte Perfusions-Bioreaktorsysteme vereinen die Möglichkeiten definierte Fluss-, Druck- und Pulsation-Zustände zu erzeugen. Die Einstellung einer bestimmten Flussrate und deren Steigerung sind wichtig für die Ausbildung eines dichten Endotheliums. Die mechanosensitiven Endothelzellen reagieren auf den durch den Fluidfluss wirkenden Scherstress auf der luminalen Seite der Gefäßprothese. Durch den Scherstress werden unter anderen die Proliferation, die Ausrichtung der Zellen, die Apoptose, die Migration und die Permeabilität beeinflusst. Ein dichtes Endothelium ist aufgrund der anti-thrombogenen Wirkung entscheidend für die Funktionalität der Gefäßprothese. Die Einstellung eines physiologischen Druckes ist ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum eines Bioreaktors für Gefäßprothesen, da ein erhöhter Druck innerhalb des Gefäßes zur Ausbildung einer festeren Gefäßwand führt. Ebenso ist die Pulsation des Druckes und des Fluides im Gefäß ein wichtiger Faktor für die Reifung der Gefäßprothese. Die zyklische Dehnung der Gefäßwand initiiert die Proliferation von vaskulären Zellen innerhalb der Gefäßwand, führt zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, reguliert die Ausbildung eines kontraktiven Phänotyps der SMCs, erhöht die Ausbildung extrazellulärer Matrix und Gewebeentwicklung und führt zur Ausrichtung der Fasern des Gewebes. Somit ist die korrekte Einstellung der Parameter Flussrate, Druck und Pulsationsfrequenz und vor allem die Einstellung dieser Parameter im zeitlichen Verlauf der Gefäßreifung essentiell für den Erfolg der Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. (Kang et al. 2013; Wolf et al. 2018; Prim et al. 2018; Eberth 2020; Li et al. 2005; Hahn und Schwartz 2009)

3.9.5 Bioartifizielle Gefäßprothesen: Stand der Technik

In diesem Abschnitt wird ein kurzer Überblick über eine Auswahl bisher in der Literatur beschriebener Konzepte für die Herstellung einer vollständig durch *Tissue Engineering* hergestellten bioartifiziellen Gefäßprothese gegeben. Sind Resultate einer klinischen Anwendung bekannt, werden diese ebenfalls dargestellt.

Grundlegende Arbeiten zur Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese wurden 1986 von Weinberg und Bell durchgeführt. Weinberg und Bell besiedelten Kollagen-*Scaffolds* mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Aufgrund schlechter mechanischer Stabilität wurden die gefertigten *Scaffolds* mit Dacron verstärkt (Weinberg und Bell 1986). 1999 besiedelten Niklasson *et al.* PGA-*Scaffolds* mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen und konditionierten diese mit Scherstress. Die Gefäße zeigten nach 4 Wochen im Tierversuche immer noch eine gute Durchlässigkeit (Niklason et al. 1999). In einer nachfolgenden Studie aus dem Jahr 2016, wurden diese Gefäße ohne Zellen als Dialysezugänge in 60 Patienten evaluiert.

Hierbei zeigte sich nach einem Jahr nur noch eine vollständige Durchlässigkeit bei 28% (Lawson et al. 2016). In einer klinischen Studie untersuchten Shin'oka *et al.* mit mesenchymalen Stammzellen besiedelte Poly(L-Milchsäure-Co-ε-Caprolactone)-*Scaffolds* in 42 Patienten mit einem Alter zwischen 1-24 Jahren. Eine gute Durchlässigkeit konnte bis zu einer maximalen Dauer von 32 Monaten beobachtet werden (Shin'oka et al. 2005). In einer späteren Studie zur Behandlung eines angeborenen Herzfehlers wurden diese *Scaffolds* ebenfalls verwendet. Hierbei konnte eine durchschnittliche Haltbarkeit von über elf Jahren demonstriert werden (Sugiura et al. 2018). Weitere biohybride Ansätze wurden zum Beispiel durch Jockenhövel *et al.* oder Atala *et al.* entwickelt. Jockenhövel *et al.* verwendeten beispielsweise ein *Scaffold* aus Fibrin und Polymilchsäure, besiedelten dieses mit arteriellen glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen und konditionierten dieses *in vitro*. Nach sechs Monaten Implantation in Schafe konnte eine gute Integration der Gefäße sowie eine gute Durchlässigkeit beobachtet werden (Koch et al. 2010). Atala *et al.* untersuchen *Scaffolds* aus Polycaprolacton und Kollagen in einem Kaninchenmodell für einen Monat. Die *Scaffolds* zeigten nach einem Monat eine strukturelle Stabilität sowie das Zellen in die *Scaffolds* eingewachsen waren (Tillman et al. 2009). In einem neueren Ansatz von Gupta *et al.* wurden beispielsweise *Scaffolds* aus Seide und Maulbeerseide hergestellt. Diese *Scaffolds* wurden jeweils mit Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen besiedelt und in Schichten zu einem Tubus übereinander gelagert. Die *Scaffolds* unterstützen das Wachstum der vaskulären Zellen und die Differenzierung der glatten Muskelzellen, ebenfalls konnte ein sehr hoher Berstdruck der *Scaffolds* gezeigt werden (Gupta et al. 2016).

Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Ansätzen wurde an dieser Stelle nur eine kurze Auswahl an Studien dargestellt. Eine umfangreichere Übersicht kann z.B. der Zusammenstellung von Pashneh-Tala *et al.* (2016) oder Matsuzaki *et al.* (2019) entnommen werden (Pashneh-Tala et al. 2016; Matsuzaki et al. 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Scaffold-Herstellung und Analyse

Für die Herstellung von künstlichem Gewebe im *Tissue Engineering* wird in den meisten Fällen eine Gerüststruktur, ein sogenanntes *Scaffold*, benötigt. *Scaffolds* bilden die Grundlage zur Besiedelung mit Zellen. Entscheidend für die Eignung eines Materials für ein *Scaffold* sind die Verarbeitungsmethode, die Struktur, die Biokompatibilität, die mechanischen Eigenschaften und die Dauer der Biodegradation (O'Brien 2011). Diese Faktoren werden im folgenden Kapitel mit geeigneten Methoden für zwei verschieden produzierte Typen eines synthetischen *Scaffolds* aus PDO untersucht. Die Herstellung dieser *Scaffolds* erfolgte einerseits durch ein Schmelzsichtungsverfahren (im Folgenden „3D-Druck“ genannt) und durch einen Salzlaugungsprozess. Die 3D-gedruckten *Scaffolds* sollten hinsichtlich der Verwendung für eine bioartifizielle Gefäßprothese untersucht werden, wohingegen die durch den Salzlaugungsprozess hergestellten *Scaffolds* bezüglich ihrer Eignung zur Vaskularisierung beurteilt wurden. Die hergestellten PDO-*Scaffolds* wurden zusätzlich zusammen mit dem natürlichen Polymer Fibrin zu biohybriden *Scaffolds* kombiniert. Ein Teil der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurde im Rahmen der Masterarbeit von Sebastian Loewner „PDO als *Scaffold*-Material für *Tissue Engineering* – Verarbeitung und Charakterisierung“ erstellt. Das Kapitel wurde teilweise veröffentlicht in Heene *et al.* 2021 (Heene *et al.* 2021).

4.1.1 Scaffold-Herstellung

In dieser Arbeit wurden *Scaffolds* für die Besiedelung mit Zellen mit zwei verschiedenen Verfahren aus Polydioxanon hergestellt. Genutzt wurden dafür ein Salzlaugungsverfahren und 3D-Druck. Beide Verfahren werden nachfolgend kurz beschrieben.

4.1.1.1 Salzlaugung

Für die Herstellung von *Scaffolds* mittels Salzlaugung wurde das Polymer Polydioxanon in Hexafluoroisopropanol gelöst. Die Lösung wurde anschließend auf Salzkristalle gegeben. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Salz durch Inkubation der PDO/Salz-Blöcke in dd. H₂O herausgelöst. Zurück bleibt das poröse *Scaffold*.

4.1.1.2 3D-Druck

Für die Herstellung von *Scaffolds* mittels 3D-Druck wurde das Polymer Polydioxanon in eine Kartusche gefüllt und erhitzt. Das flüssige Polymer wurde mit Druckluft durch eine Düse extrudiert. Anhand eines 3D-Modells wurde so eine *Scaffold*-Struktur mit diesem Schmelzsichtverfahren erstellt. Bei einer Temperatur von 125 °C konnten bei einem Druck

von 400 kPa unter Verwendung einer Düse mit einem Durchmesser von 0,1 mm ein optimales Ergebnis erzielt werden (Abbildung 6).

4.1.2 Analyse und Vergleich der Scaffold-Strukturen aus 3D-Druck und Salzlaugung

Die *Scaffolds*, welche durch 3D-Druck und Salzlaugung aus PDO hergestellt wurden, wurden in einem ersten Schritt miteinander verglichen, um sich für weitere Versuche auf die besser geeignete Herstellungsmethode zu fokussieren.

4.1.2.1 Optische Analyse der Oberflächenstruktur

Für einen initialen Vergleich der PDO-*Scaffold*-Strukturen wurden Übersichtsaufnahmen und mikroskopische Aufnahmen der *Scaffolds* untersucht und miteinander verglichen.

Die mittels 3D-Druck und Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich (Abbildung 6). Die 3D-gedruckten *Scaffolds* haben durch das 3D-Modell eine geordnete und vorgegebene Struktur. Diese geordnete Struktur war auch in der Seitenansicht bei einem aufgeschnittenen *Scaffold* zu erkennen. Die Stränge wurden in einer „Holzstapel“-Struktur angeordnet. Im Gegensatz dazu ist die Struktur der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* chaotisch.

Beide Arten von *Scaffolds* wiesen Artefakte am Rand auf, d.h. die Stränge der 3D-gedruckten Stränge waren am Rand miteinander verschmolzen und die durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* wiesen am Rand der Form eine dünne Schicht PDO auf. Aus diesem Grund wurde jeweils nur der innere Teil der *Scaffolds* in weiteren Analysen betrachtet.

Die Größe der Poren an der Oberfläche der *Scaffolds* wurde zum Vergleich untersucht. Dabei wiesen die mittels 3D-Druck hergestellten *Scaffolds* einen Abstand der Stränge von $167 \mu\text{m} \pm 14 \mu\text{m}$ auf, während die Größe der Poren der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* mit $326 \mu\text{m} \pm 149 \mu\text{m}$ bestimmt wurde. Die Dicke der Stränge bei den 3D-gedruckten *Scaffolds* wurde mit $153 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ gemessen. Im Vergleich dazu ließ sich die Wandstärke der Poren bei den mittels Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* aufgrund der uneinheitlichen Wandstruktur nur näherungsweise auswerten, gemessen wurde eine durchschnittliche Wandstärke von $54 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$.

Bei den 3D-gedruckten *Scaffolds* konnte eine deutliche thermische Degradation festgestellt werden. Diese äußerte sich in einer gesteigerten Viskosität während des Druckprozesses, wodurch *Scaffolds*, welche mit identischen Druckparametern gedruckt wurden, anhängig von der Dauer des Erhitzens des PDO, eine stark abweichende Qualität aufwiesen (Abbildung 43).

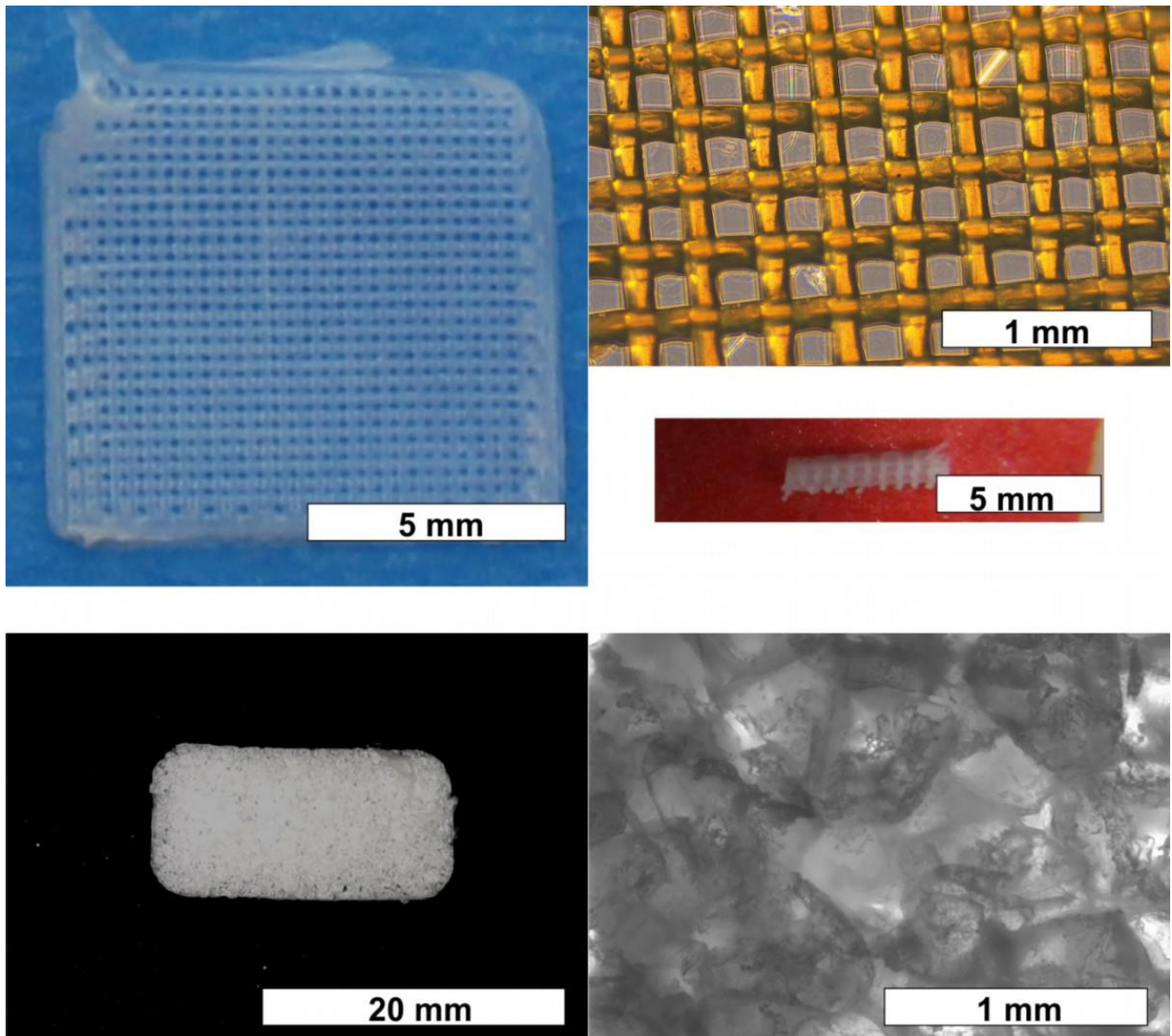


Abbildung 6: Übersichtsaufnahmen und mikroskopische Aufnahmen der mittels 3D-Druck und Salzlaugung hergestellten *Scaffolds*. Für einen initialen Vergleich der *Scaffold*-Strukturen wurden Übersichtsaufnahmen der 3D-gedruckten *Scaffolds* (oben links, mittig rechts) und der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* (unten links) sowie mikroskopische Aufnahmen der 3D-gedruckten *Scaffolds* (oben rechts) und der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* (unten rechts) gemacht.

4.1.2.2 Analyse der Biokompatibilität mittels CTB-Assay

Die Biokompatibilität der PDO-*Scaffolds* wurde mittels eines CTB-Assays untersucht. Der CTB-Assay misst die metabolische Aktivität der Zellen auf Basis der Reaktion von Resazurin zu Resorufin, somit kann auf die Zellviabilität geschlossen werden. In dieser Arbeit wurde jeweils ein Extrakt untersucht, welcher sowohl aus dem Filament der 3D-gedruckten PDO-*Scaffolds* als auch aus den mittels Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* gewonnen wurde.

Anhand der Ergebnisse zur Bestimmung der Viabilität der Zellen konnte keine Zytotoxizität der Extrakte der *Scaffolds* festgestellt werden (Abbildung 7). Bei allen getesteten Konzentrationen von beiden Proben lag die Viabilität bei über 94%. Nach einer Inkubation der

Zellen mit dem Extrakt des PDO-Filaments für 24 h konnte bei der höchsten Konzentration von 200 mg/mL eine Viabilität von $95,5\% \pm 3,3\%$ gemessen werden. Bei den Zellen, welche mit dem Extrakt aus den mittels Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* inkubiert worden sind, konnte eine minimale Viabilität von $94,4\% \pm 2,9\%$ für eine Extrakt-Konzentration von 50 mg/mL festgestellt werden. Beide *Scaffold*-Typen zeigen somit eine nach DIN EN ISO 10993 definierte Biokompatibilität von über 90%.

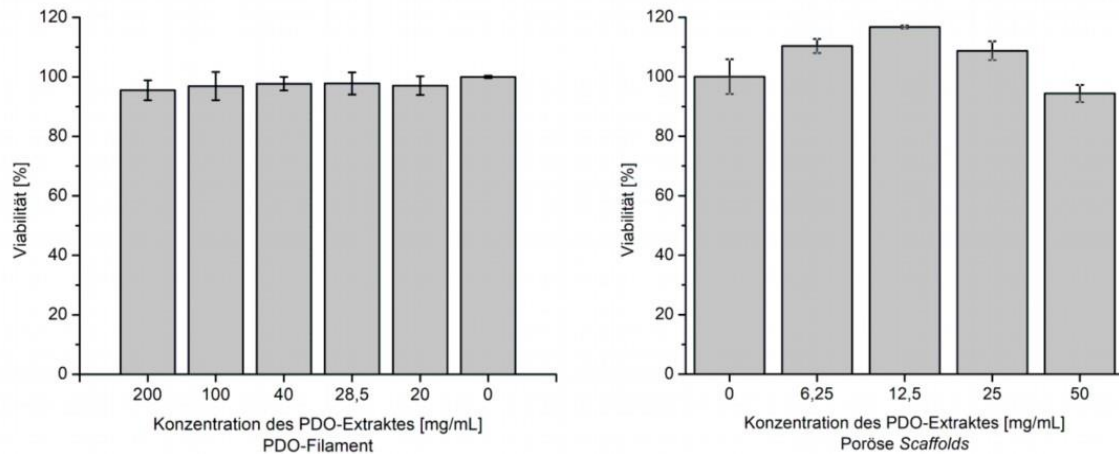


Abbildung 7: Ergebnisse der CTB-Tests zur Untersuchung der Biokompatibilität der PDO-Scaffolds. Für die Untersuchung der Biokompatibilität der PDO-Scaffolds wurde jeweils ein Extrakt durch Inkubation des PDO-Filaments und der mittels Salzlaugung hergestellten Scaffolds in Zellkulturmedium bei 37 °C gewonnen. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Extrakt inkubiert und anschließend der Umsatz von Resazurin zu Resorufin im Vergleich zu einer unbehandelten Probe bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

4.1.2.3 Analyse der mechanischen Eigenschaften durch Zugversuche

Die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds aus 3D-Druck und Salzlaugung wurden durch Zugversuche an einer Testmaschine (Instron 5565A) analysiert. Hierfür wurden Probekörper nach DIN EN ISO 527-2:2012 vom Typ 1BA (mittels Salzlaugung) und 1BB (mittels 3D-Druck) hergestellt (Abbildung 8).

Für die 3D-gedruckten Testkörper vom Typ 1BB konnten eine Bruchdehnung von $16,1\% (\pm 2,01\%)$, eine maximale Zugfestigkeit von $15,95 \text{ MPa} (\pm 2,24 \text{ MPa})$ und einen Young's Modulus von $12,00 \text{ MPa} (\pm 1,81 \text{ MPa})$ bestimmt werden. Der Bruch der 3D-gedruckten Testkörpern trat immer an einem Ende des mittleren Steges der Testkörper auf. Die mittels Salzlaugung hergestellten Testkörper wiesen eine Bruchdehnung von $24,3\% (\pm 1,31\%)$, eine maximale Zugfestigkeit von $0,142 \text{ MPa} (\pm 0,046 \text{ MPa})$ und einen Young's Modulus von $1,054 \text{ MPa} (\pm 0,485 \text{ MPa})$ auf. Bei den durch Salzlaugung hergestellten Testkörpern konnte keine feste Bruchstelle lokalisiert werden, stattdessen erfolgte ein Abriss des Testkörpers aufgrund von vielen kleinen Einschnürungen.

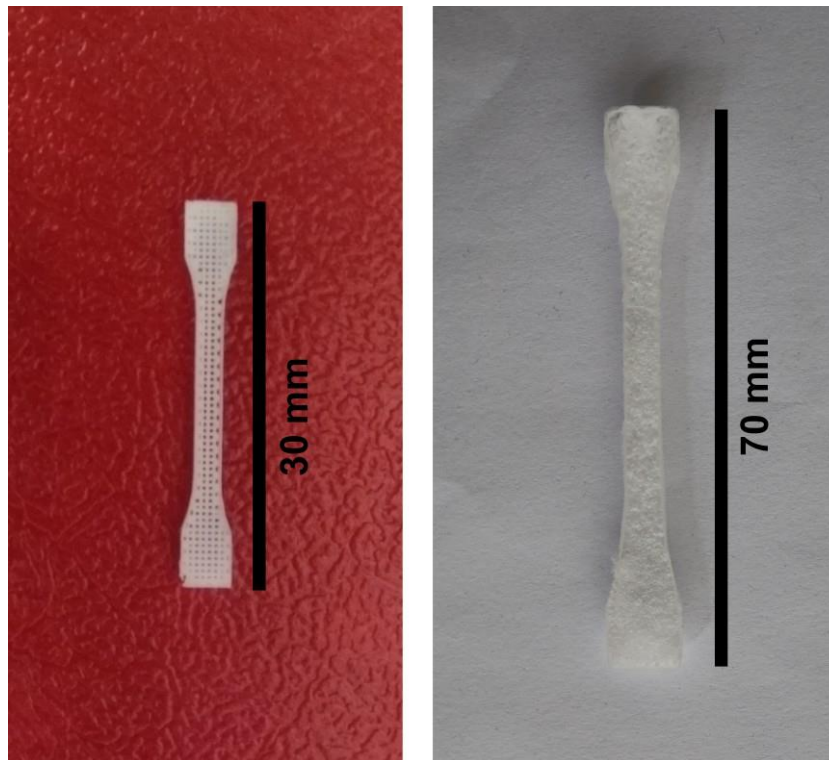


Abbildung 8: Hergestellte Testkörper für die Analyse der mechanischen Eigenschaften der PDO-Scaffolds. Für die Analyse der mechanischen Eigenschaften wurden Testkörper nach DIN EN ISO 527-2:2012 vom Typ 1BB mittels 3D-Druck (links) mit einem Auffüllgrad von 25% und vom Typ 1BA mittels Salzlaugung (rechts) hergestellt.

4.1.2.4 Erste Besiedelungen zur Evaluation der Eignung der Scaffold-Konstrukte

Für die Evaluation der Eignung der *Scaffolds* für das *Tissue Engineering* wurden erste Besiedelungsversuche mit Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden sowohl 3D-gedruckte *Scaffolds* als auch *Scaffolds*, welche durch Salzlaugung hergestellt wurden, mit Fibrinogen beschichtet und mit 250.000 HUVECs und 50.000 MSCs in einer Thrombin-Lösung besiedelt und für 14 Tage im Brutschrank inkubiert.

Auf beiden *Scaffold*-Typen zeigte sich nach 14-tägiger Kultivierung der Zellen ein Bewuchs der *Scaffolds* (Abbildung 9). Die Zellen wuchsen auf den Strukturen der PDO-*Scaffolds* und bildeten eine dichte Schicht, wie durch die Färbung des Zytoskeletts durch Phalloidin-iFluor 555 und der Zellkerne durch Hoechst 33342 (Darstellung in blau) zu erkennen ist (Abbildung 9). Im Vergleich zeigte sich auf den *Scaffolds*, welche durch Salzlaugung hergestellt wurden, dass die Besiedelung mit Zellen deutlich ausgeprägter war. Die Zellen wuchsen im Gegensatz zu den mittels 3D-Druck hergestellten *Scaffolds* nicht nur auf den PDO-Strukturen, sondern auch in die Poren ein. Bei den 3D-gedruckten *Scaffolds* zeigten sich deutliche Lücken in der Zellstruktur zwischen den Strängen. Der Abstand der Stränge betrug in diesem Versuch auf dem gezeigten Bild $\sim 334 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$, die Größe der Lücken $\sim 290 \mu\text{m} \pm 33 \mu\text{m}$.

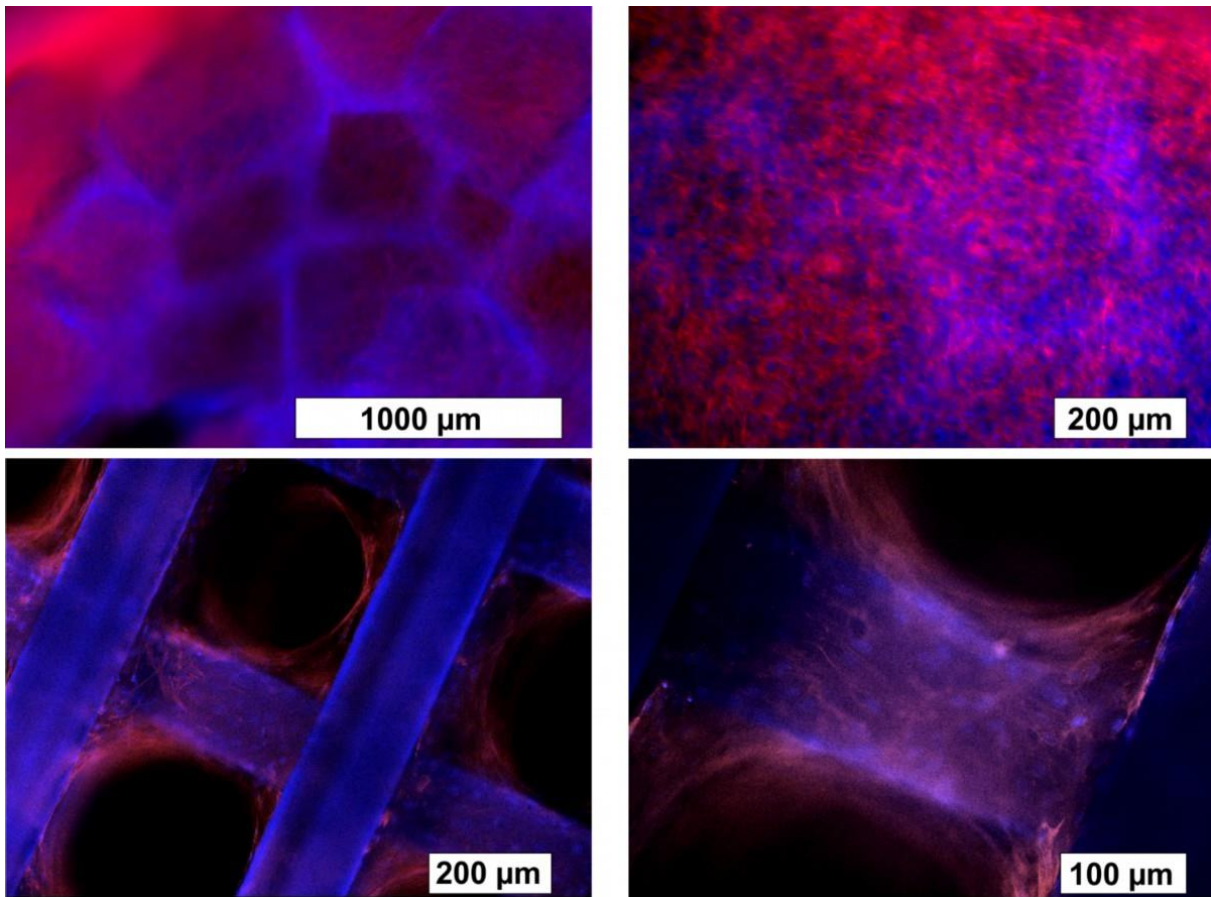


Abbildung 9: Erste Besiedelungsversuche mit den hergestellten Scaffolds. Zur Testung der Scaffolds für das Tissue Engineering wurden sowohl durch Salzlaugung hergestellte Scaffolds (oben) als auch 3D-gedruckte Scaffolds (unten) mit 250.000 HUVECs und 50.000 MSCs besiedelt und für 14 Tage bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂ inkubiert. Die Bilder zeigen Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Scaffolds. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau), das Zytoskelett mit Phalloidin-iFluor 555 (rot).

Aufgrund der Lücken in der Zellstruktur auf den 3D-gedruckten Scaffolds und der im Gegensatz dazu stehenden feineren Porenstruktur und des besseren Einwachsens der Zellen in die poröse Struktur der mittels Salzlaugung hergestellten Scaffolds wurde in weiteren Experimenten ein Fokus auf die Analyse und Besiedelung dieser Scaffolds gelegt. Die weitere Verbesserung der mittels 3D-Druck hergestellten Scaffolds wurde an dieser Stelle aufgrund der Fokussierung auf die anderen Scaffolds aus dieser Arbeit ausgegliedert.

4.1.2.5 Analyse der Struktur und Degradation von durch Salzlaugung hergestellten Scaffolds

Die Degradationsrate ist ein entscheidender Faktor für die Nutzbarkeit eines Materials für das Tissue Engineering. Für die Analyse der Degradation wurden morphologische Veränderungen der Oberflächenstruktur mittels mikroskopischer Aufnahmen und der inneren Struktur durch µCT-Analyse untersucht. Des Weiteren wurde der prozentuale Gewichtsverlust des porösen PDO-Scaffolds nach Inkubation in PBS-Puffer bis zu vier Wochen bei 37 °C untersucht.

4.1.2.5.1 Analyse der Oberflächenstruktur mittels Phasenkontrastmikroskopie

Die Oberflächenstruktur poröser PDO-*Scaffolds* wurde vor und nach vier Wochen Inkubation in PBS-Puffer bei 37 °C mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht (Abbildung 10). Der Vergleich der Oberflächenstruktur vor und nach Inkubation in PBS-Puffer zeigte keine erkennbaren morphologischen Unterschiede. Die Porenstruktur an der *Scaffold*-Oberfläche erschien unverändert.

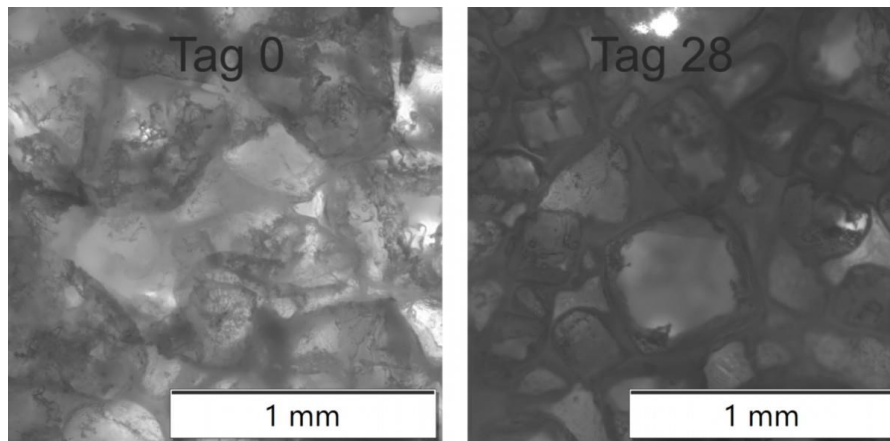


Abbildung 10: Vergleich der Oberflächenstruktur poröser PDO-*Scaffolds* vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen. Die *Scaffolds* wurden für vier Wochen bei 37 °C im Inkubator in PBS-Puffer inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde die Oberflächenstruktur der *Scaffolds* mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert.

4.1.2.5.2 Analyse der inneren Struktur der porösen *Scaffolds* mittels μ CT

Die innere Struktur der porösen PDO-*Scaffolds* wurde mittels μ CT untersucht. Zu diesem Zweck wurden ein eben erst produziertes *Scaffold* und ein *Scaffold* nach 28 Tagen Inkubation in PBS-Puffer bei 37 °C untersucht. Aus den μ CT-Aufnahmen wurden sowohl Schnittbilder als auch eine 3D-Rekonstruktion erstellt.

Die 3D-Rekonstruktion der porösen *Scaffolds* zeigt eine hohe Porosität und Interkonnektivität der untersuchten *Scaffolds* (Abbildung 11). Die Porengröße konnte mittels μ CT aufgrund der hohen Interkonnektivität der Poren nicht bestimmt werden. Die Porosität wurde aus der 3D-Rekonstruktion mit 76,38% bestimmt. Ein Unterschied in der Morphologie der *Scaffolds* zwischen einem neu generierten *Scaffold* und einem bereits 28 Tage lang in PBS-Puffer inkubierten *Scaffold* konnte nicht festgestellt werden.

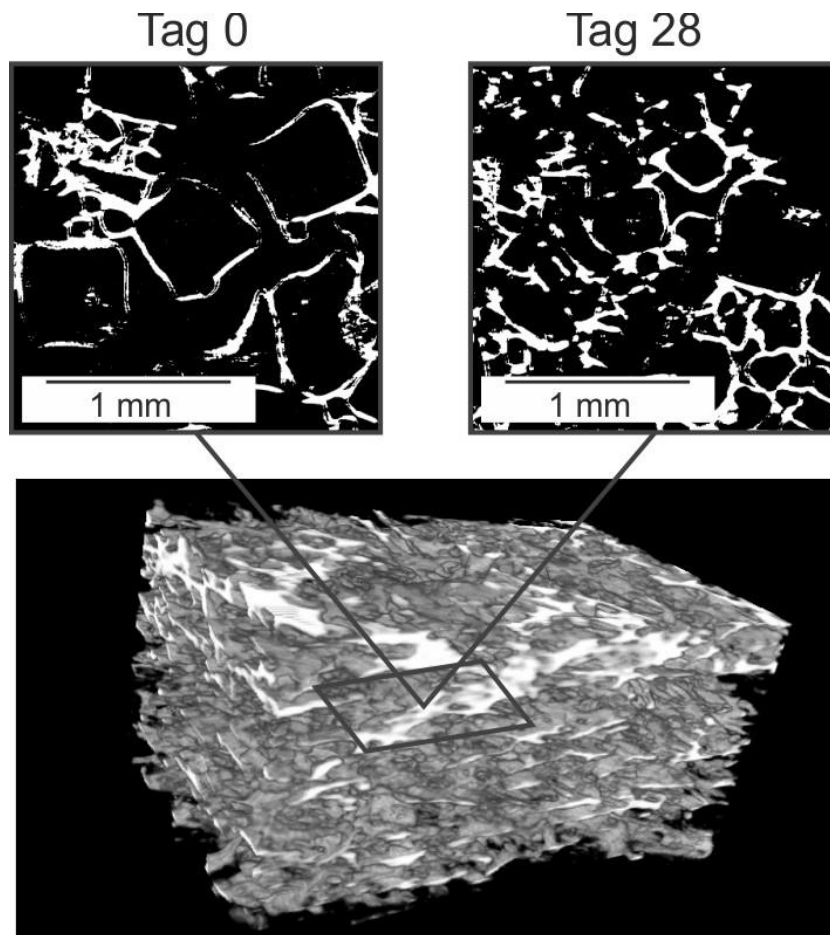


Abbildung 11: μ Ct-Aufnahmen eines porösen PDO-Scaffolds vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen und rekonstruierte Geometrie. Die innere Struktur der porösen PDO-Scaffolds wurde mittels μ CT vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen bei 37 °C untersucht. Die Abbildung zeigt je einen Querschnitt durch das Scaffold vor und nach Inkubation sowie eine rekonstruierte 3D-Geometrie.

4.1.2.5.3 Messung des Gewichtsverlusts poröser PDO-Scaffolds durch Degradation

Der prozentuale Gewichtsverlust poröser PDO-Scaffolds innerhalb von vier Wochen Inkubation in PBS-Puffer wurde durch Wiegen bestimmt. Es konnte ein ansteigender Gewichtsverlust innerhalb der 4 Wochen festgestellt werden (Abbildung 12). Nach einer Woche wurde ein Gewichtsverlust von $1,6\% \pm 0,3\%$, nach zwei Wochen von $3,8\% \pm 1,3\%$, nach drei Wochen von $5,4\% \pm 0,5\%$ und nach 4 Wochen von $4,6 \pm 0,5\%$ gemessen.

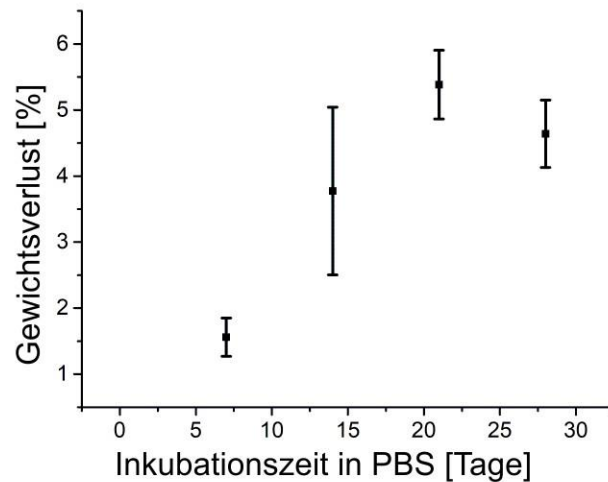


Abbildung 12: Prozentualer Gewichtsverlust der porösen PDO-Scaffolds nach Inkubation in PBS-Puffer. Für die Analyse der Degradation der porösen PDO-Scaffolds wurden diese bei 37 °C in PBS inkubiert und der prozentuale Gewichtsverlust an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Eine Untersuchung der *Scaffolds* über einen längeren Zeitraum konnte nicht durchgeführt werden, da die *Scaffolds* nach 4 Wochen zu instabil für weitere Analysen waren. Die *Scaffolds* waren bereits bei geringer mechanischer Belastung (z. B. mit einem Spatel) sehr brüchig und wirkten nicht mehr elastisch. Bei Berührung zerfielen sie in kleinere Bruchstücke (Abbildung 13).

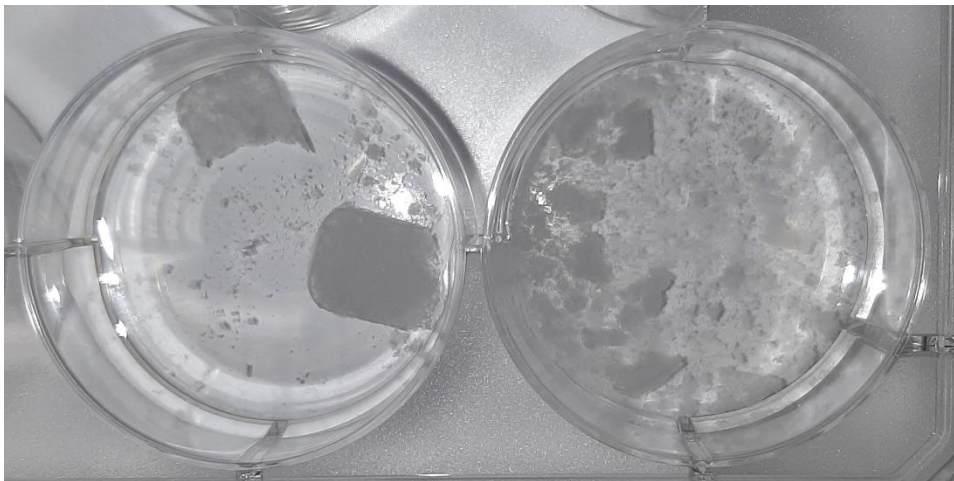


Abbildung 13: Instabile, poröse PDO-Scaffolds nach Inkubation in PBS-Puffer länger als 4 Wochen. Bei einer Inkubation länger als 4 Wochen in PBS-Puffer bei 37 °C wurden die *Scaffolds* instabil und zerfielen bei Berührung.

4.1.2.5.4 Analyse der mechanischen Eigenschaften der Scaffolds vor und nach Besiedelung und Kultivierung

Die mechanischen Eigenschaften der porösen *Scaffolds* wurden als Zusatz zur Analyse unbesiedelter *Scaffolds* durch Zugversuche mittels Nanoindentation untersucht. Analysiert wurden hierbei ein poröses PDO-Scaffold, ein zusätzlich mit Fibrin beschichtetes, poröses

PDO-*Scaffold* und zwei mit Zellen besiedelte, mit Fibrin beschichtete, poröse PDO-*Scaffolds*. Von den beiden mit Zellen besiedelten *Scaffolds* wurde eines für einen Tag im Inkubator inkubiert und eines für 28 Tage.

Die Elastizität der *Scaffolds* wurde durch Bestimmung des effektiven Young's Modulus ermittelt (Abbildung 14). Bei einem unbesiedelten, unbeschichteten *Scaffold* wurde ein Wert von $2691 \text{ Pa} \pm 2053 \text{ Pa}$ und bei einem unbesiedelten, beschichteten *Scaffold* ein Wert von $4405 \text{ Pa} \pm 3536 \text{ Pa}$ bestimmt. Somit erhöhte die Beschichtung mit Fibrin den effektiven Young's Modulus der *Scaffolds* deutlich. Bei einem beschichteten, mit Zellen besiedelten *Scaffold* nach einem Tag Inkubation konnte ein deutlich geringerer Wert von $1108 \text{ Pa} \pm 1334 \text{ Pa}$ ermittelt werden, dieser war im Vergleich bei einem *Scaffold* nach 28 Tagen Inkubation wieder auf $3118 \text{ Pa} \pm 967 \text{ Pa}$ erhöht.

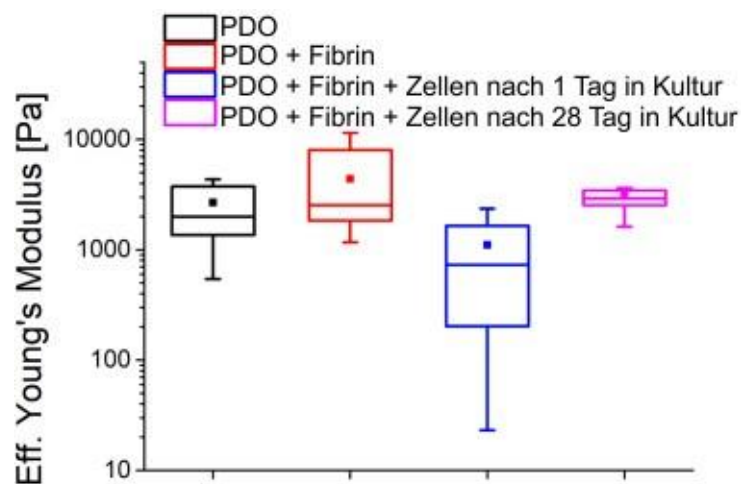


Abbildung 14: Ergebnisse der mittels Nanoindentation ermittelten Werte für den effektiven Young's Modulus. Vier verschiedene *Scaffolds* wurden mittels Nanoindentation untersucht. Ein poröses PDO-*Scaffold*, ein zusätzlich mit Fibrin beschichtetes, poröses PDO-*Scaffold* und zwei mit Zellen besiedelte, mit Fibrin beschichtete, poröse PDO-*Scaffolds* (eines nach einem Tag Inkubation und eines nach 28 Tagen Inkubation bei 37°C , $21\% \text{ O}_2$ und $5\% \text{ CO}_2$).

Die erhöhte Flexibilität der *Scaffolds* durch die Besiedelung mit Zellen konnte auch durch ihre erhöhte mechanische Belastbarkeit beobachtet werden. Im Gegensatz zu den in Abbildung 13 dargestellten, unbesiedelten und unbeschichteten *Scaffolds* zerfallen die in Abbildung 15 dargestellten *Scaffolds* nicht bei leichten Berührungen und erhalten ihre Form über einen längeren Zeitraum (bis zu mehreren Monaten). Es sind keine Poren zu erkennen und die *Scaffolds* sind von einer dichten Schicht an zellulärem Material überzogen.

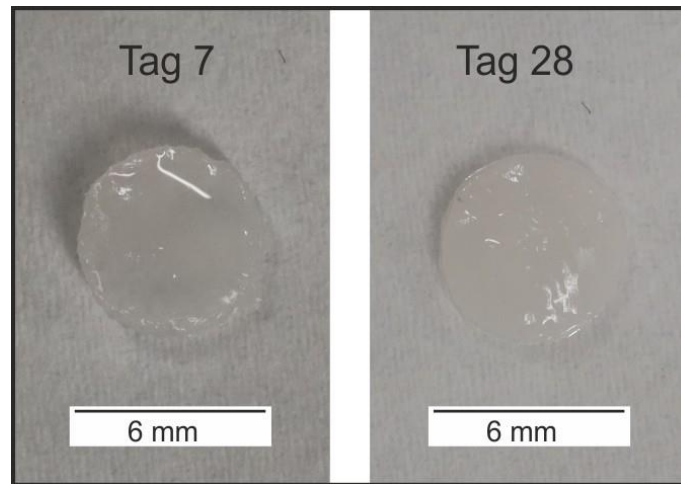


Abbildung 15: Übersichtsaufnahme besiedelter Scaffolds nach sieben und 28 Tagen Inkubation. Die Scaffolds wurden mit 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs besiedelt und bei 37 °C, 21% O₂ und 5% O₂ für 7 und 28 Tage inkubiert.

4.1.2.6 Fibrinogen-Gewinnung durch Kryopräzipitation und Analyse der Bestandteile

Für die Herstellung eines biohybriden Scaffolds aus einem synthetischen und einem biologischen Polymer, welches ein bestmögliches Wachstum der Zellen auf den Scaffolds ermöglicht, werden die PDO-Scaffolds mit Fibrin beschichtet. Dieses bildet eine gelartige Schicht mit idealen Wachstumsbedingungen für die Zellen. Für eine optimale Kompatibilität des Fibrins bei späteren Implantationen der erstellten Scaffolds sollte dieses auch aus autologen Quellen gewonnen und mit kommerziell erhältlichem Fibrinogen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde aus Leukozyten-reduziertem Blutplasma ein Protein-Kryopräzipitat gewonnen und durch Dialyse (siehe Abschnitt 8.3.1.2.1) aufgereinigt, um die Konzentration von Proteinen unter 100 kD zu reduzieren. Der Sinn dieser Aufreinigung besteht darin, potenziell fibrinolytische und somit die Festigkeit des beschichteten Scaffolds gefährdende Bestandteile zu entfernen. Zuerst wurde der Gesamtproteingehalt des Präzipitates mit einem BCA-Assay untersucht und der Fibrinogen-Anteil nach Clauss siehe (Abschnitt 8.3.1.2.3) bestimmt. Zuletzt wurde die Zusammensetzung des Präzipitates mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um das Vorhandensein von Fibrinogen und anderen Proteinen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Folgenden näher ausgeführt.

4.1.2.6.1 Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung und Bestimmung des Fibrinogen-Anteils

Die Gesamtproteinkonzentration des Proteinpräzipitates wurde mit einem BCA-Assay gemessen. Im Anschluss wurde die Konzentration von Fibrinogen nach Clauss (durchgeführt

vom Zentrallabor der Medizinischen Hochschule Hannover) bestimmt und der Anteil am Gesamtprotein berechnet.

Aus 180 mL Leukozyten-reduziertem Blutplasma wurden $2,01 \text{ g} \pm 0,77 \text{ g}$ Proteinpräzipitat mittels Kryopräzipitation isoliert. Mit dem BCA-Assay wurde eine Gesamtproteinkonzentration im Präzipitat von $86,6 \text{ mg/mL} \pm 3,5 \text{ mg/mL}$ gemessen. Der Fibrinogenanteil wurde mit ca. $41\% \pm 29,9\%$ bestimmt.

4.1.2.6.2 SDS-PAGE des mittels Kryopräzipitation gewonnenen Proteinpräzipitats

Die Zusammensetzung des durch Kryopräzipitation gewonnenen Proteinpräzipitats wurde im ersten Schritt mit einer SDS-PAGE untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Probe des Präzipitats vor und nach Dialyse zusammen mit einer Vergleichsprobe aus kommerziell erhältlichem Fibrinogen in zwei Gelelektrophoresen mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Probenpuffer analysiert. Somit konnte sowohl die Größe der enthaltenen Proteine im nicht-reduzierten Zustand bestimmt werden als auch die Größe der Protein-Untereinheiten nach Reduktion der Proteine.

Sowohl in den Proben des Proteinpräzipitats vor (Probe 2) und nach (Probe 3) Dialyse als auch in der Vergleichsprobe des kommerziell erhältlichen Fibrinogens (Probe 1) konnte am oberen Ende des Gels bei der Verwendung von nicht-reduzierendem Probenpuffer eine starke Bande beobachtet werden (Abbildung 16A). Diese Bande hat eine Größe von ca. 340 kDa und wurde somit als Fibrinogen angesehen. Ebenso wurde eine weitere stark ausgeprägte Bande zwischen 45 und 60 kDa in den Proben des Proteinpräzipitates beobachtet. Diese Bande konnte auch in der Probe des kommerziell erhältlichen Fibrinogens beobachtet werden. Bei dem Vergleich der Proben des Proteinpräzipitats vor und nach Dialyse konnte eine geringfügige Reduzierung der Proteinkonzentration festgestellt werden. Die Banden waren im Bereich unter 100 kDa etwas weniger stark ausgeprägt. Bei der Verwendung von reduzierendem Probenpuffer zum Auftragen der Proben bei der SDS-PAGE konnten drei neue Banden mit den Größen 48, 55 und 68 kDa bei allen drei Proben beobachtet werden (Abbildung 16B). Diese lassen sich den drei Untereinheiten, der α -Kette, der β -Kette und der γ -Kette, des Fibrinogens zuordnen. Ebenfalls war eine Bande im Bereich um 66 kDa zu erkennen, welche in der Probe des kommerziell erhältlichen Fibrinogens nur schwach ausgeprägt, in den beiden Proben des Proteinpräzipitats aber stark ausgeprägt, war. Bei dieser Bande handelt es sich basierend auf der Größe um Albumin.

4.1.2.6.3 Western Blot zum Nachweis von Fibrinogen im Proteinpräzipitat

Der Erfolg der Isolierung von Fibrinogen aus dem Leukozyten-reduziertem Blutplasma wurde ebenfalls durch einen Western Blot zum spezifischen Nachweis der Fibrinogen- α -Kette überprüft. Hierfür wurden die Proteine nach der SDS-PAGE aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend zuerst mit einem Anti-Fibrinogen- α -Ketten-Antikörper und nachfolgend mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper gegen den Primär-Antikörper inkubiert. Durch einen DAB-Assay konnte so die Bindung des Primär-Antikörpers auf der Membran an das Zielprotein visualisiert werden.

Die Bindung des Anti-Fibrinogen- α -Ketten-Antikörpers an die Fibrinogen- α -Kette konnte sowohl bei der Vergleichsprobe von kommerziell erhältlichem Fibrinogen als auch bei den beiden Proteinpräzipitat-Proben durch einen bräunlichen Farbumschlag nach Durchführung des DAB-Assays auf der Membran nachgewiesen werden (Abbildung 16C).

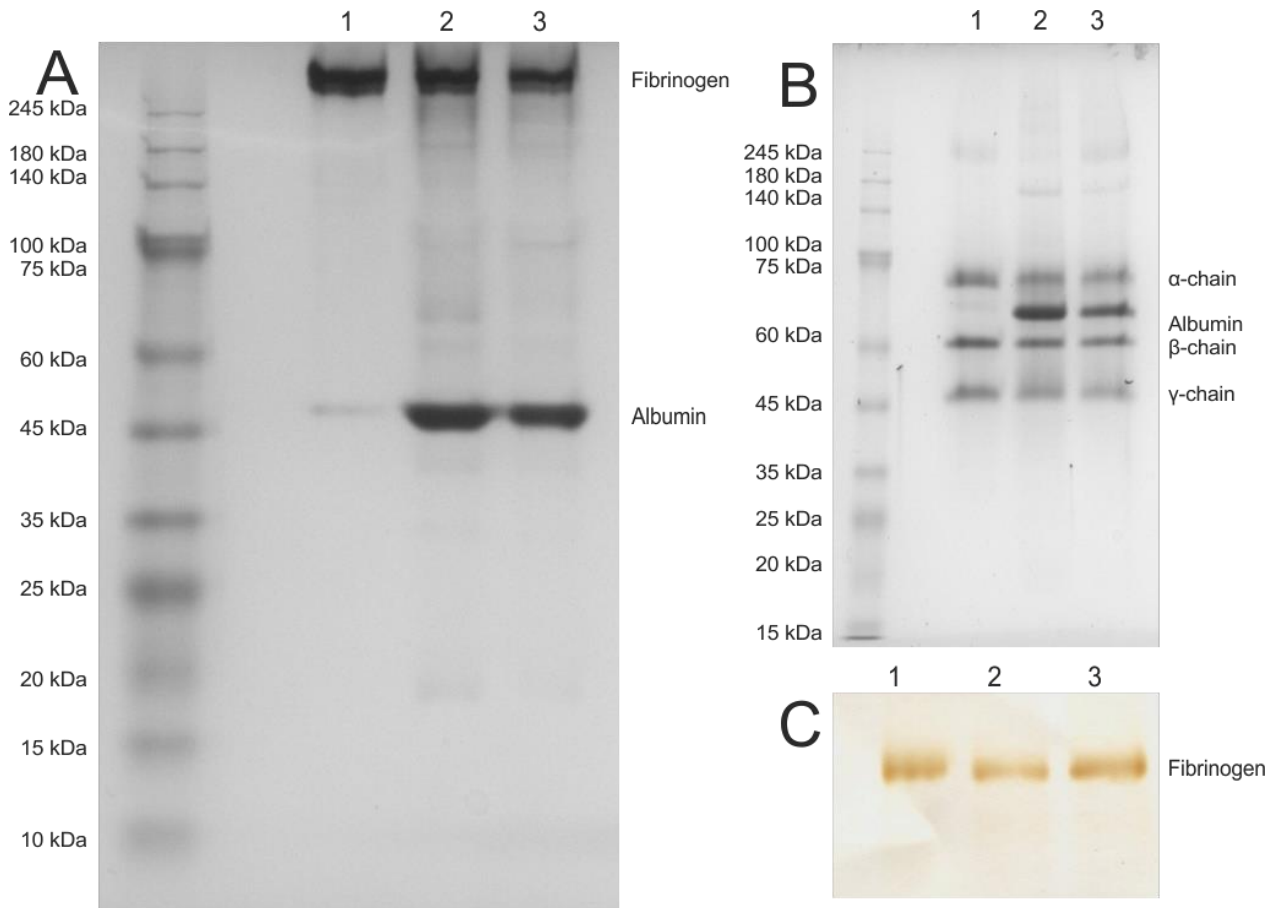


Abbildung 16: Ergebnisse der SDS-PAGE und des Western Blot zur Analyse des mittels Kryopräzipitation isolierten Proteinpräzipitats aus Leukozyten-reduziertem Blutplasma. Das aus Leukozyten-reduziertem Blutplasma durch Kryopräzipitation gewonnene Proteinpräzipitat wurde zuerst mit einer SDS-PAGE mit sowohl nicht-reduzierendem (A) und reduzierendem (B) Probenpuffer untersucht. Im zweiten Schritt wurde ein Western Blot zum Nachweis der Fibrinogen- α -Kette (C) durchgeführt. Untersucht wurden jeweils eine Probe von kommerziell erhältlichem Fibrinogen (1) und das selbst gewonnene Proteinpräzipitat vor (2) und nach (3) Dialyse mit einem MWCO von 100 kDa.

4.2 Entwicklung von Kapillaren

Die Vaskularisierung von durch *Tissue Engineering* hergestelltem Gewebe ist entscheidend für die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Auf Basis der in Kapitel 1 vorgestellten porösen, mit Fibrin beschichteten PDO-*Scaffolds*, welches durch Salzlaugung hergestellt wurde, wird im folgenden Abschnitt dargestellt, wie sich, unter Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen und humanen venösen Nabelschnur-Endothelzellen, eine Vaskularisierung von kleinen Gewebestücken mit Kapillargefäßen erreichen lässt. Ein Teil dieses Kapitels wurde veröffentlicht in Heene *et al.* 2021 (Heene et al. 2021).

Basierend auf vorangegangenen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen auf porösen PLLA/PLGA-*Scaffolds* nach Besiedelung mit HUVECs und MSCs wurde eine Optimierung anhand der bisherigen Ergebnisse durchgeführt. In diesen vorherigen Versuchen wurden die Zellen in einem Verhältnis von 250.000/50.000 (5:1) angesiedelt und entweder zuerst mit einer 1:1 Mischung von EGM-2- und α -MEM-Zellkulturmedium für 24 Stunden, gefolgt von weiteren sieben Tagen mit reinem α -MEM-Zellkulturmedium oder mit konditioniertem α -MEM-Zellkulturmedium (Thoms 2019). Voraussetzung für diese Versuche sind Versuche der Arbeitsgruppe, bei denen unter hypoxischen Inkubationsbedingungen mit einem O₂-Sättigungsgehalt von 2,5% *HIF-1*-induzierte Angiogenesemarker von Stammzellen in das Medium sezerniert wurden. Ihre Wirkung fördert die kapillare Netzwerkbildung der unreifen Endothelzellen (=HUVECs). Ergebnisse dieser Versuche werden derzeit zu einer Publikation zusammengefasst. (Papandreou et al. 2006; Herbert und Stainier 2011)

Für die Optimierung wurden in ersten Schritten sowohl das Zellverhältnis als auch die Zusammensetzung des Zellkulturmediums variiert und in weiteren Analysen die Bedeutung der MSCs und des Fibrins untersucht. Zuletzt wurde eine Methode zur Quantifizierung der Netzwerkstrukturen entwickelt und auf die optimierten Kultivierungsansätze angewendet.

4.2.1 Optimierung des Zellzahlverhältnisses und der Zellmenge von HUVECs und MSCs und der Zusammensetzung des Zellkulturmediums für eine optimale Netzwerkbildung auf den porösen PDO-*Scaffolds*

Das richtige Zellzahlverhältnis, die Gesamtzellzahl und die Zusammensetzung des Zellkulturmediums sind wichtig für eine optimale Besiedelung und Vaskularisierung der porösen PDO-*Scaffolds*. Zu diesem Zweck wurden diese Parameter in verschiedenen Versuchsansätzen variiert.

4.2.1.1 Erste Optimierung: Auswirkungen des Zellzahlverhältnisses

Für die initiale Optimierung des Zellzahlverhältnisses wurden HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 50.000/250.000 (1:5), 100.000/150.000 (2:3) und 250.000/50.000 (5:1) angesiedelt und für 14 Tage kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde eine Mischung aus 50% konditioniertem α MEM und 50% frischem, basalem α MEM verwendet. Die Auswertung der besiedelten *Scaffolds* erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Variation des Zellzahlverhältnisses bei der Besiedelung der PDO-*Scaffolds* führte zu deutlich unterschiedlicher Ausprägung der Netzbildung der HUVECs nach 10 und 14 Tagen in Kultur (Abbildung 17). Bei einem Verhältnis von 5:1 war auf den *Scaffolds* eine ausgeprägte Netzbildung zu beobachten. Durch die Erhöhung des Anteils der AD-hMSCs auf ein Verhältnis von 2:3 konnte die Netzbildung weiter gesteigert werden. Auf den *Scaffolds* war zu beobachten, dass im Vergleich zu den mit einem Verhältnis von 5:1 besiedelten *Scaffolds*, sich die Netzwerke über größere Bereiche der *Scaffolds* erstreckten. Bei einer weiteren Steigerung des Anteils der AD-hMSCs zu einem Verhältnis von 1:5 konnte im Gegensatz zur Steigerung zu einem Verhältnis von 2:3 beobachtet werden, dass auf den *Scaffolds* nur sehr wenige Netzwerkstrukturen vorhanden waren.

Die Verwendung von einem Verhältnis von 2:3 wurde auf Basis dieser Ergebnisse für weitere Versuchsreihen als am besten geeignet bewertet.

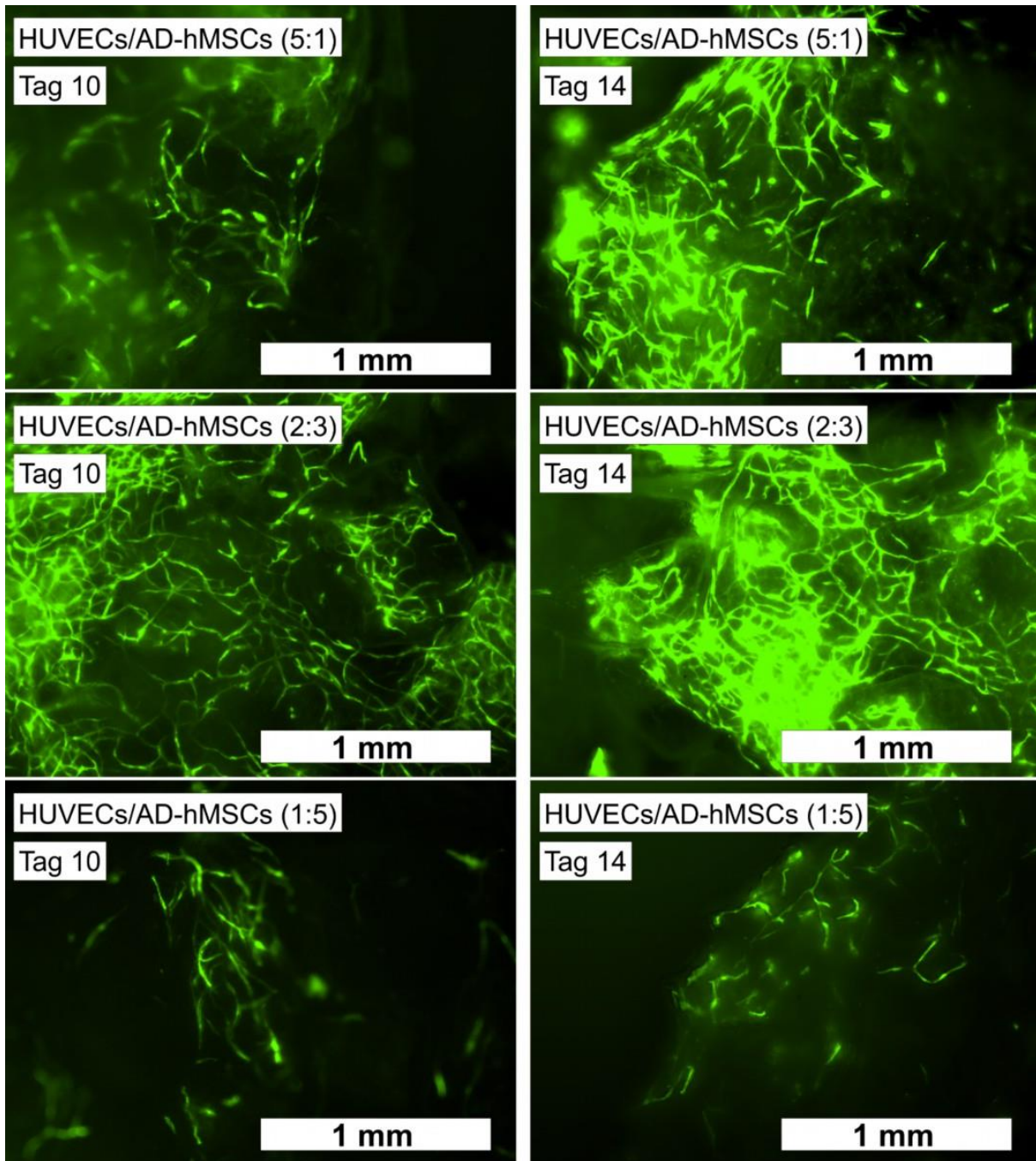


Abbildung 17: Optimierung des Zellzahlverhältnisses. Für die Optimierung des Zellzahlverhältnisses wurden HUVECs und MSCs im Verhältnis 50.000/250.000 (1: 5), 100.000/150.000 (2:3) und 250.000/50.000 (5:1) auf den *Scaffolds* angesiedelt und für 14 Tage mit 50% konditioniertem α MEM und 50% frischem, basalem α MEM kultiviert. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP exprimierenden HUVECs nach zehn und 14 Tagen Kultivierung.

4.2.1.2 Zweite Optimierung: Auswirkungen der Gesamtzellzahl und des verwendeten Zellkulturmediums

Im zweiten Optimierungsschritt wurden HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 100.000/150.000 (2:3) und 200.000/300.000 (2:3) angesiedelt, um die Auswirkungen einer erhöhten Gesamtzellzahl zu untersuchen. Zusätzlich wurden diese Zellzahlkombinationen mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien getestet. Das erste Zellkulturmedium bestand aus

konditioniertem α MEM und basalem α MEM in einem Verhältnis von 1:1 (Medium A), das zweite aus konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 (Medium B). Die Zellen auf den besiedelten *Scaffolds* wurden für sieben und 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der besiedelten *Scaffolds* erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die qualitative Auswertung dieser ersten Besiedelung zeigte keine Unterschiede zwischen der Verwendung von einer Gesamtzellzahl von 250.000 oder 500.000 Zellen auf die Netzwerkbildung und Gesamtzellzahl. Die *Scaffolds* waren bereits bei einer Besiedelung mit einer Gesamtzellzahl von 250.000 vollständig bedeckt. Eine gesteigerte Netzwerkbildung konnte bei der Verwendung von 50% frischem EGM-2 festgestellt werden. Nach 14 Tagen in Kultur konnten unter allen Bedingungen auf den *Scaffolds* nahezu keine Netzwerkstrukturen mehr identifiziert werden, die *Scaffolds* waren im Gegensatz dazu dicht mit MSCs besiedelt.

In weiteren Versuchen wurde eine Gesamtzellzahl von 250.000 Zellen mit einem Verhältnis von 100.000/150.000 (2:3; HUVECs:MSCs) verwendet. Ebenso wurde ein Medium, welches aus 50% EGM-2 besteht, aufgrund dieser Ergebnisse als vorteilhaft bewertet und für weitere Versuche verwendet.

4.2.1.3 Dritte Optimierung: Verbesserung der Medienzusammensetzung

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde dem Zellkulturmedium aus konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 zusätzlich 2% frisches FKS zugesetzt. Als Vergleich wurden zusätzlich Zellen auf *Scaffolds* mit voll supplementiertem EGM-2 und frischem α MEM kultiviert. Die Auswertung der besiedelten *Scaffolds* erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die qualitative Auswertung der Netzwerkstrukturen zeigte eine deutliche Steigerung der Anzahl und Dichte der Netzwerkstrukturen bei Zugabe von frischem HS im Vergleich zu vorherigen Kultivierungen. Bei der Verwendung von frischem α MEM und EGM-2 mit zugehörigem Supplement-Mix in einem Verhältnis von 1:1 zeigten die HUVECs keine Netzwerkbildung, stattdessen war eine Überwucherung der *Scaffolds* durch die HUVECs zu beobachten.

Basierend auf diesem Ergebnis wurde in den folgenden Versuchen 2% frisches HS zum Zellkulturmedium hinzugefügt. Auf die Verwendung von voll supplementiertem EGM-2-Zellkulturmedium wurde aufgrund des Überwachsens des *Scaffolds* durch die HUVECs verzichtet.

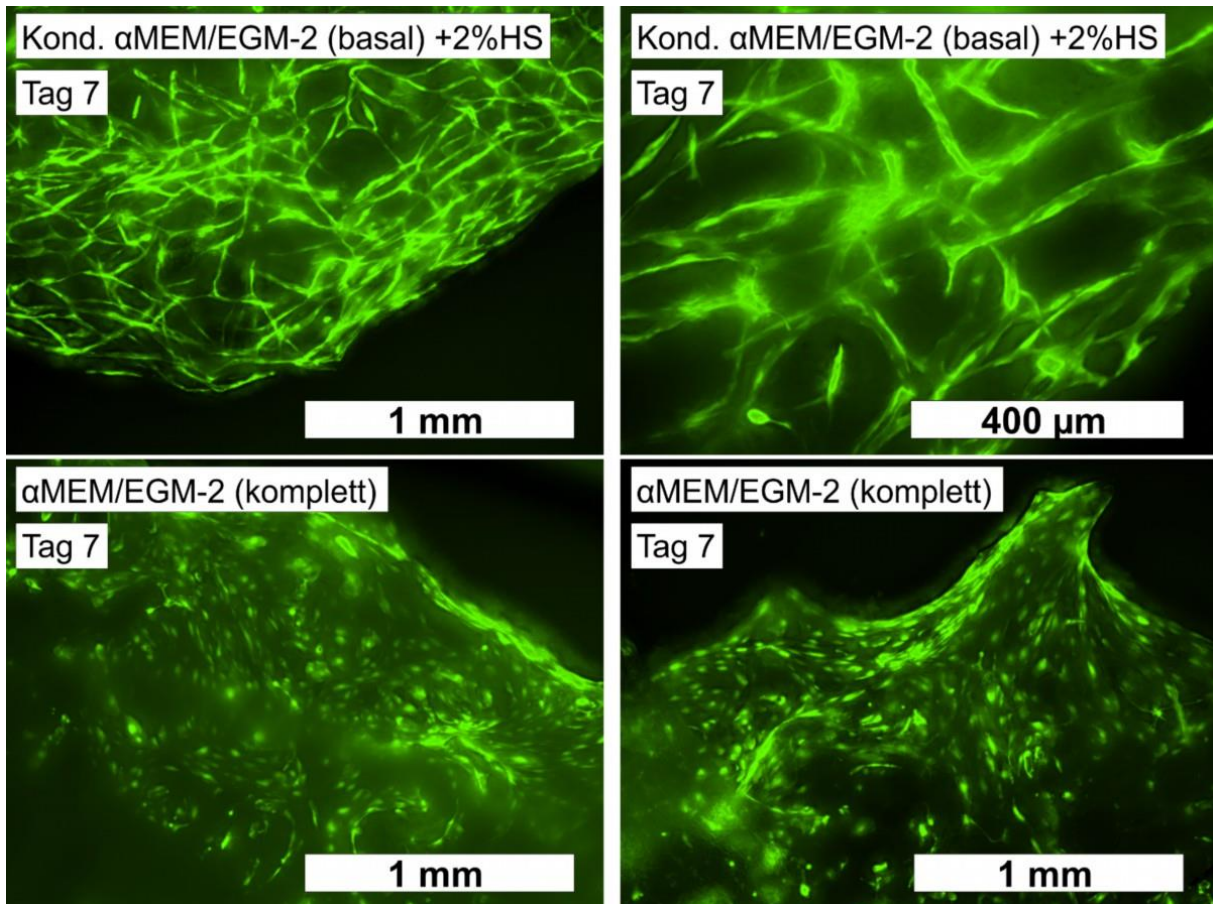


Abbildung 18: Auswirkungen der Zugabe von frischem HS zum konditionierten Zellkulturmedium im Vergleich zu frischem, voll supplementiertem Zellkulturmedium. Die Auswirkungen der Zugabe von 2% frischem HS zum Zellkulturmedium aus konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 im Vergleich zu einer 1:1 Mischung aus frischem α MEM und voll supplementiertem EGM-2 wurde nach Kultivierung von 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* untersucht. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP exprimierenden HUVECs nach sieben Tagen Kultivierung.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Optimierung der Netzwerkbildung der HUVECs in Ko-Kultur mit MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* wurden zu folgenden Erkenntnissen zusammengefasst:

- Ein Zellzahlverhältnis von 2:3 (HUVECs:MSCs) scheint am besten geeignet zu sein für eine gute Netzwerkbildung.
- Eine Gesamtzellzahl von 250.000 Zellen ist ausreichend für eine vollständige Besiedelung der *Scaffolds*.
- Das Zellkulturmedium sollte zu 50% aus EGM-2 bestehen.
- Eine Zugabe von 2% frischem HS zum Zellkulturmedium steigert die Netzwerkbildung deutlich.

In allen Experimenten konnte trotz der zu erkennenden Tendenzen hinsichtlich Zellzahlverhältnis, Gesamtzellzahl und verwendetem Zellkulturmedium jedoch eine starke

Varianz der Ergebnisse bei Wiederholungen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten versucht, das mit Wachstumsfaktoren angereicherte, konditionierte α MEM durch künstlich mit Wachstumsfaktoren angereichertes, frisches α MEM zu ersetzen.

4.2.2 Auswirkungen der Zugabe einer definierten Menge an Wachstumsfaktoren zum Zellkulturmedium und Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung der HUVECs

Aufgrund der starken Varianz in den zuvor erzielten Ergebnissen wurde das konditionierte α MEM durch frisches mit Wachstumsfaktoren angereichertes α MEM ersetzt. Als Wachstumsfaktoren wurden VEGF-A und bFGF in einer Konzentration von 10 ng/mL verwendet. Die Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung der HUVECs auf den porösen PDO-*Scaffolds* wurde im folgenden Experiment ebenfalls untersucht. Zu diesem Zweck wurden die *Scaffolds* sowohl mit HUVECs und MSCs besiedelt als auch nur mit HUVECs.

Der Zusatz von VEGF-A und bFGF zum Zellkulturmedium führt reproduzierbar zu einer ausgeprägten Netzwerkbildung auf den PDO-*Scaffolds*. Diese ist stärker und gleichmäßiger auf dem gesamten *Scaffold* im Vergleich zur Verwendung von konditioniertem Zellkulturmedium (Vergleich Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19).

Die MSCs sind entscheidend für eine erfolgreiche Netzwerkbildung der HUVECs. Der Vergleich von mit und ohne MSCs besiedelten *Scaffolds* zeigt, dass ohne die MSCs kein Einwuchs der Zellen in die Hohlräume der Poren stattfindet (Abbildung 19). Auf Abbildung 19A ist das Ergebnis einer Ko-Kultur zu sehen. Auf dem gesamten *Scaffold* haben die HUVECs eine gleichmäßige Netzwerkstruktur gebildet, es sind keine Poren zu erkennen. Werden auf den *Scaffolds* nur HUVECs kultiviert (Abbildung 19B), bilden diese eine Schicht auf der Oberfläche der Poren, es findet kein Einwuchs der Zellen in die Hohlräume der *Scaffolds* statt und diese Hohlräume sind klar zu identifizieren. Eine Vergrößerung der Netzwerkstrukturen in Kokultur mit zusätzlich angefärbten Zellkernen (Abbildung 19C) zeigt, dass um die Netzwerke viele weitere Zellkerne vorhanden sind. Somit lässt sich zeigen, dass die Netzwerkstrukturen der HUVECs in die MSCs eingebettet sind.

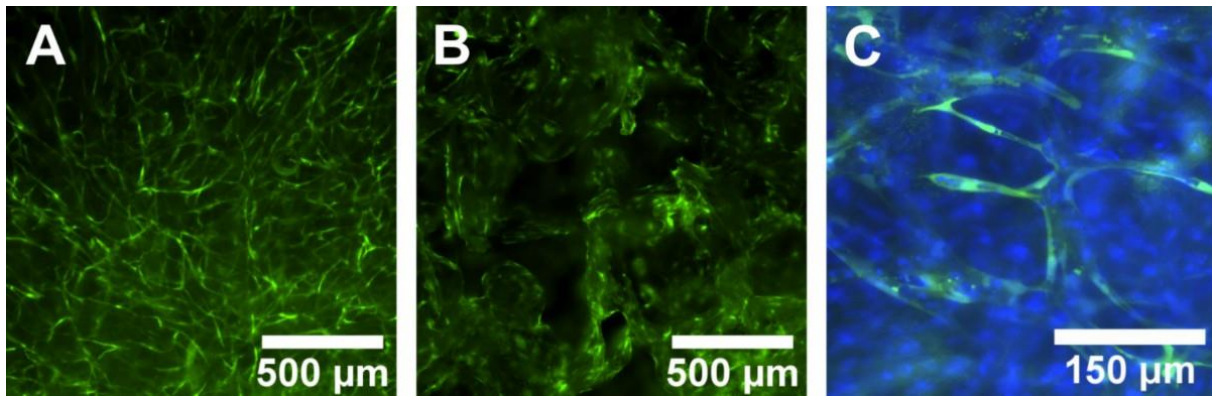


Abbildung 19: Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-Scaffolds. Zur Untersuchung der Bedeutung von MSCs für die Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-Scaffolds wurden entweder nur HUVECs oder eine Kokultur aus HUVECs und MSCs auf die Scaffolds angesiedelt (100.000 HUVECs/150.000 MSCs) und für sieben Tage kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde α -MEM/EGM-2 (1:1) mit 2% HS, 10 ng/mL VEGF und 10 ng/mL bFGF verwendet. A: HUVECs in Kokultur mit MSCs, Übersichtsaufnahme. B: HUVECs in Monokultur, Übersichtsaufnahme. C: HUVECs in Kokultur mit MSCs, Detailaufnahme, Zellkerne sind zusätzlich mit Hoechst 33342 gefärbt.

Der Einwuchs der Zellen in die Poren des PDO-Scaffolds konnte ebenfalls durch Paraffinschnitte gezeigt werden (Abbildung 20). Zusätzlich zu einer dichten Schicht aus Zellen auf der Oberfläche der Scaffolds können diese ebenso innerhalb der Poren des Scaffolds erkannt werden.

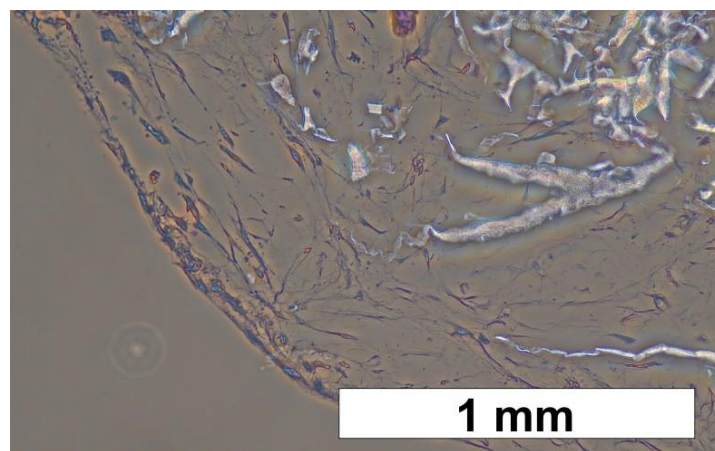


Abbildung 20: Aufnahme eines Paraffinschnittes durch ein mit HUVECs und MSCs besiedeltes PDO-Scaffold. Das Scaffold wurde mit HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 2:3 besiedelt. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂. Das Bild zeigt eine Phasenkontrast-Aufnahme eines 5 µm Paraffinschnittes.

4.2.3 Bedeutung der Fibrin-Beschichtung für die Netzwerkbildung der HUVECs

Ebenso wie die Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung der HUVECs wurde analysiert, welche Auswirkungen die Beschichtung mit Fibrin auf die Netzwerkbildung hat. Hierfür wurden sowohl Scaffolds mit und ohne Fibrin-Beschichtung für sieben Tage mit HUVECs und MSCs kultiviert.

Die Kultivierung von Zellen auf den *Scaffolds* ohne Fibrinbeschichtung führte zu einem ungleichmäßigen Bewuchs der *Scaffolds*, es fand kein vollständiger Einwuchs der Zellen in die Poren statt und die HUVECs wuchsen teilweise konfluent auf der *Scaffold*-Oberfläche (Abbildung 21). Eine Netzwerkbildung war nur geringfügig zu beobachten.

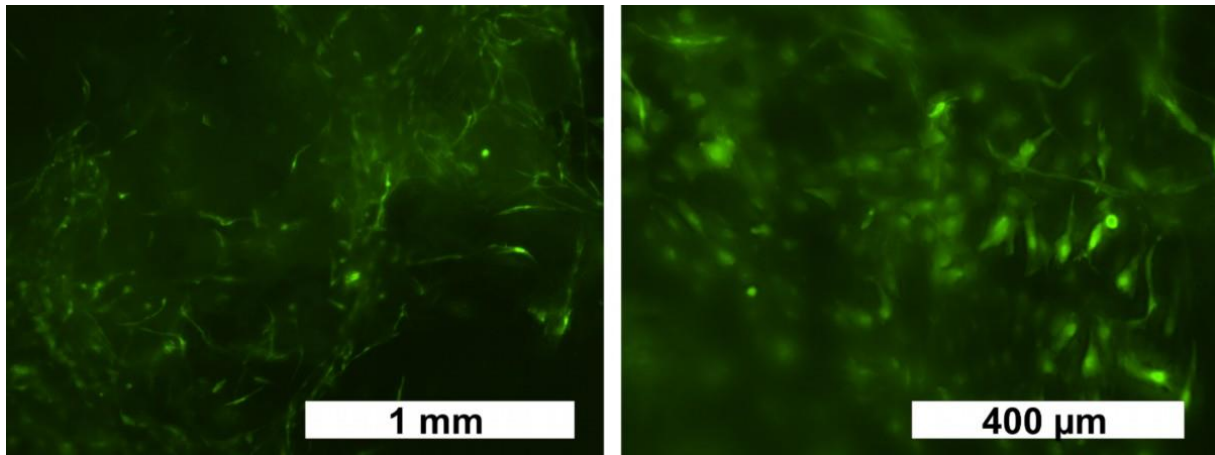


Abbildung 21: *Scaffold*-Bewuchs und Netzwerkbildung nach Besiedelung ohne Fibrinbeschichtung nach sechs Tagen in Kultur. HUVECs und MSCs wurden in einem Verhältnis von 2:3 (100.000:150.000) auf den *Scaffolds* angesiedelt und für sechs Tage kultiviert. Während der Besiedelung wurde auf die Beschichtung der *Scaffolds* mit Fibrin verzichtet.

4.2.4 Verlauf der Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-*Scaffolds*

Der Verlauf der Netzwerkbildung der HUVECs in Kokultur mit MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* wurde für sieben Tage analysiert.

Nach zwei Tagen in Kultur waren die HUVECs gleichmäßig auf dem *Scaffold* verteilt (Abbildung 22). Bis zu Tag vier lagern sich die Zellen in Clustern (siehe Pfeil) zusammen, diese sind mit undefinierten Strängen verbunden. Ab Tag sechs waren diese Cluster zu deutlichen Netzwerkstrukturen auf den *Scaffolds* organisiert (siehe Pfeil). Diese Netzwerkstrukturen waren an Tag sieben noch ausgeprägter (siehe Pfeile).

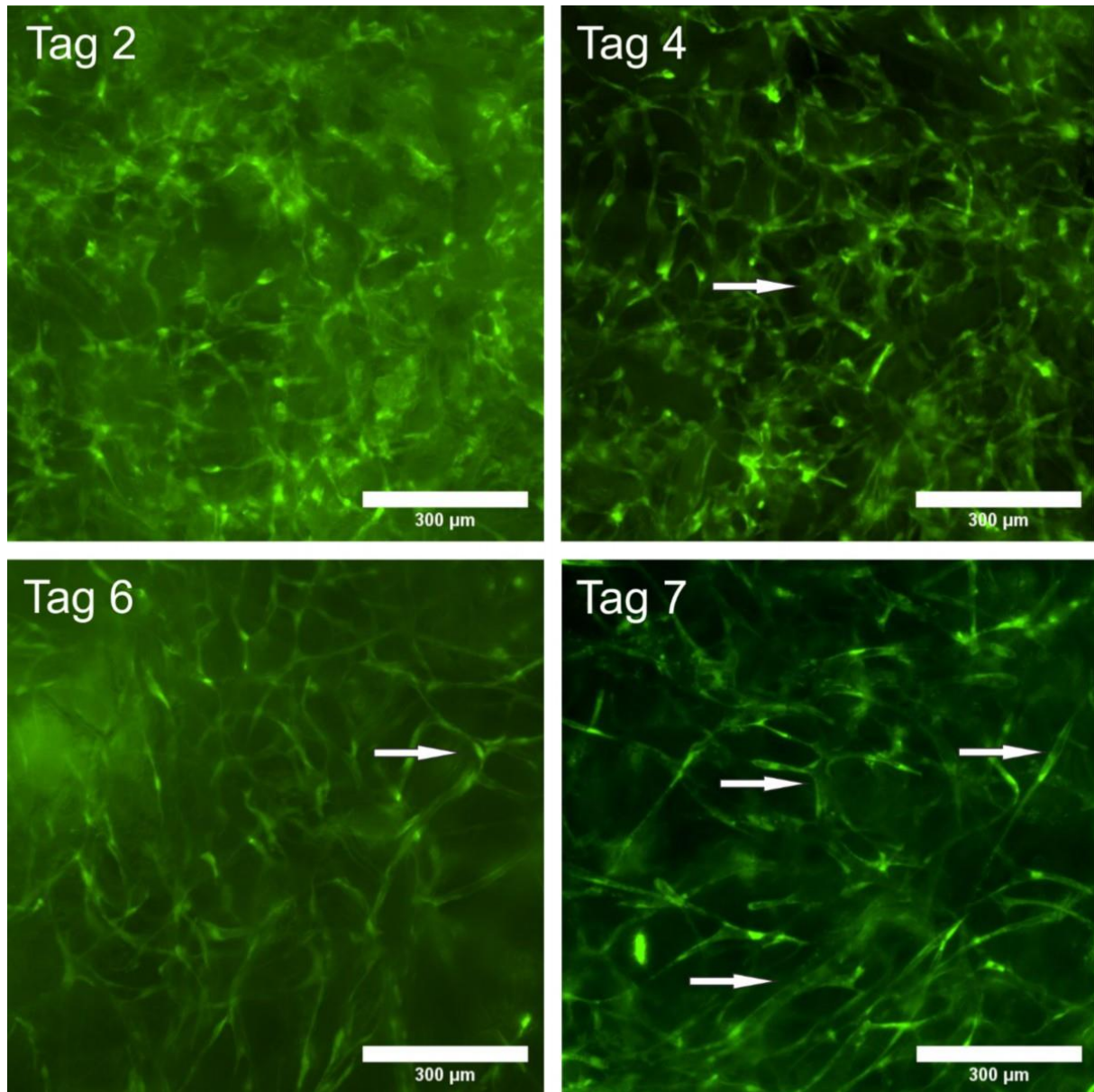


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-Scaffolds. Die HUVECs wurden in Ko-Kultur mit MSCs (100.000/150.000 Zellen) auf porösen, mit Fibrin beschichteten PDO-Scaffolds für sieben Tage kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde α -MEM/EGM-2 (1:1) mit 2% HS, 10 ng/mL VEGF und 10 ng/mL bFGF verwendet.

4.2.5 Optimierung der Netzwerkbildung: Analyse der Auswirkung der Konzentration von Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium

Um die Ausbildung der Netzwerkstrukturen der HUVECs in Kokultur mit MSCs auf den porösen PDO-Scaffolds zu optimieren, wurde die Konzentration von VEGF und bFGF variiert. Zusätzlich zu diesen beiden Wachstumsfaktoren wurde dem Medium Hydrocortison in einer Konzentration von 20 ng/mL zugesetzt. Getestet wurden die Kombinationen 10/10/0 ng/mL (VEGF/bFGF/Hydrocortison; Medium 1), 10/10/20 ng/mL (Medium 2), 20/20/0 ng/mL

(Medium 3) und 20/20/20 ng/mL (Medium 4). Nach sieben Tagen in Kultur wurde die Netzwerkbildung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die qualitative Auswertung der Netzwerkstrukturen auf den besiedelten *Scaffolds* (Abbildung 23) zeigt, dass die Dichte des Netzwerkes mit steigender Konzentration an VEGF und bFGF zunimmt (Vergleich Abbildung 23 Medium 1 und 3). Bei einer Zugabe von Hydrocortison nimmt die Ausprägung der Netzwerkstrukturen noch einmal zu (Medium 2 zu Medium 1 und Medium 4 zu Medium 2).

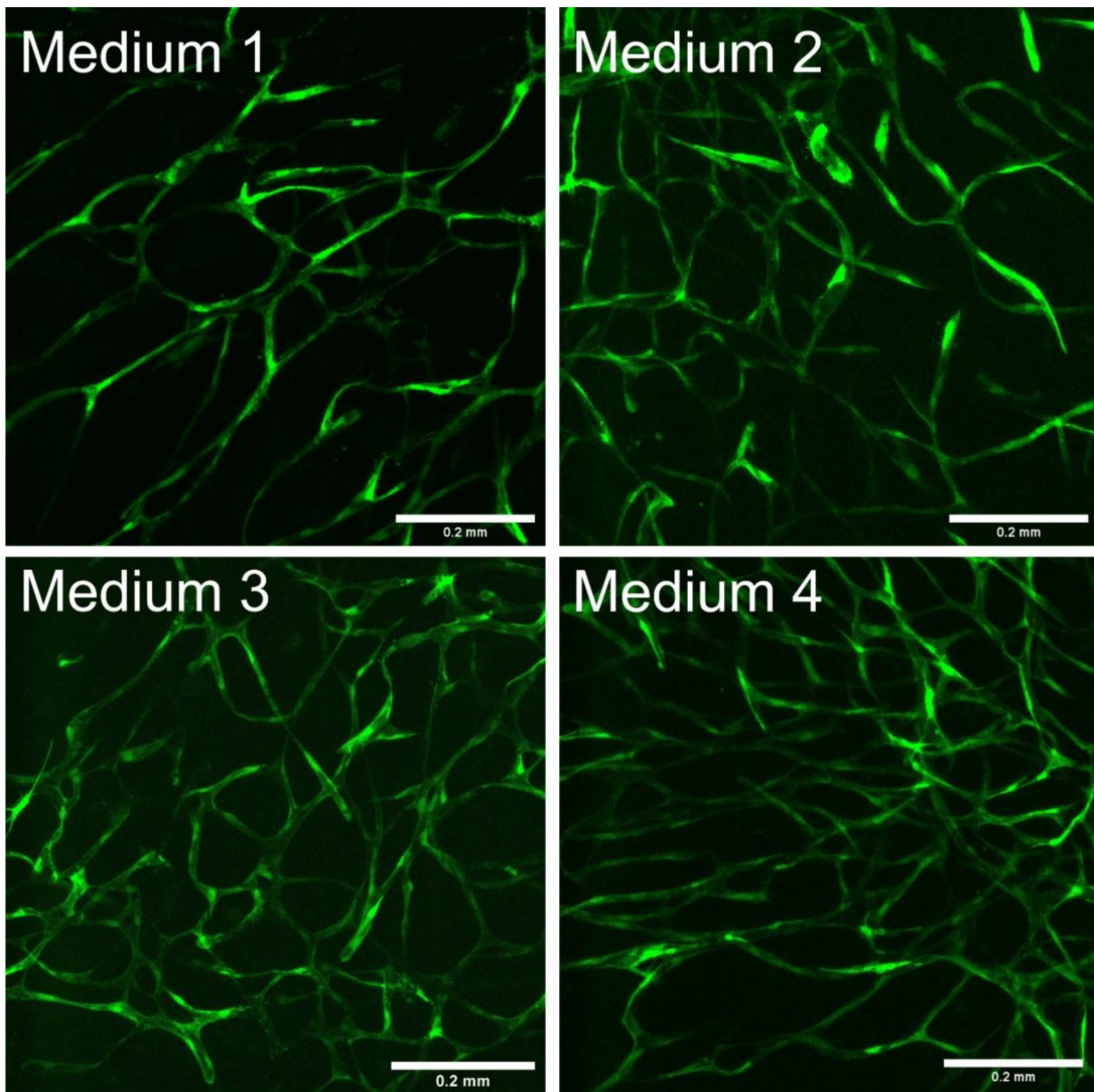


Abbildung 23: Netzwerkbildung auf *Scaffolds* nach Kultivierung mit Zellkulturmedien mit unterschiedlicher Konzentration an Wachstumsfaktoren. Die HUVECs in Kokultur mit MSCs wurden auf den porösen PDO-*Scaffolds* für sieben Tage kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF, bFGF und Hydrocortison versetzt. Verwendet wurden die Konzentrationen 10/10/0 ng/mL (VEGF/bFGF/Hydrocortison; Medium 1), 10/10/20 ng/mL (Medium 2), 20/20/0 ng/mL (Medium 3) und 20/20/20 ng/mL (Medium 4).

4.2.6 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Netzwerkbildung

Da eine vorherige Analyse der Fluoreszenzbilder in Abbildung 23 nur ein qualitatives Ergebnis liefert, wurde eine Methode für eine quantitative Auswertung der Netzwerkstrukturen entwickelt. Hierbei wurde ein zuvor optimiertes Bild der Netzwerkwerkstrukturen mit AngioTool ausgewertet.

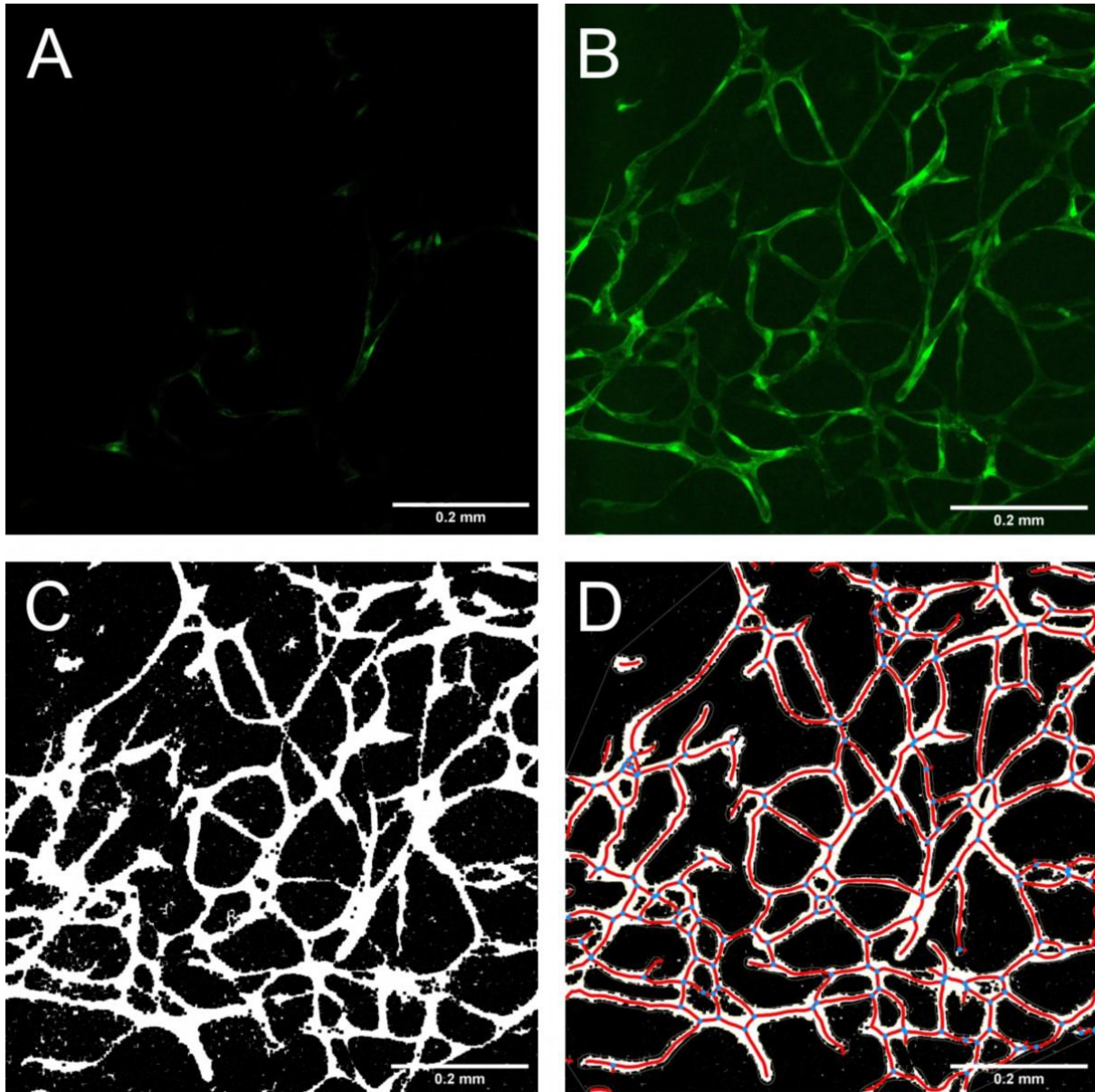


Abbildung 24: Ablauf der Netzwerkanalyse mit anschließender AngioTool-Auswertung. Die Auswertung der Netzwerkstrukturen der HUVECs auf den porösen PDO-Scaffolds wurde in vier Schritten durchgeführt. A: Aufnahme von konfokalen Fluoreszenzbildern. B: Erstellung einer Überlagerung der Einzelbilder. C: Erstellung einer Maske. D: Analyse mit AngioTool.

Die Verarbeitung der Bilder und die Auswertung der Netzwerkstrukturen erfolgten in vier Schritten (Abbildung 24):

- A) Aufnahme von je 100 konfokalen Bildern des GFP-Fluoreszenzsignals in einem Abstand von 2 μm .
- B) Erstellung einer Überlagerung der konfokalen Bilder für eine optimale Darstellung aller Strukturen des Netzwerks.
- C) Erstellung einer Maske mit dem AngioTool Mask Creator zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz.
- D) Finale Anpassung der Maske durch Abgleich mit der Überlagerung und Analyse mittels AngioTool.

4.2.7 Quantifizierung der Netzbildung mittels AngioTool

Die Auswirkungen der Zusammensetzung des Zellkulturmediums auf die Netzwerkkomplexität wurden anhand des zuvor dargestellten Verfahrens mit AngioTool ausgewertet (Abschnitt 4.2.6).

Wie bereits auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 23 zu erkennen, führt die Steigerung der Konzentration von VEGF und bFGF von 10 ng/mL auf 20 ng/mL zu einer stärker ausgeprägten Gesamtgefäßlänge, mehr Verzweigungen und einer größeren Gefäßfläche (Abbildung 25). Die Zugabe von 20 ng/mL Hydrocortison zum Zellkulturmedium führt sowohl bei 10 ng/mL und 20 ng/mL jeweils zu einer deutlichen Steigerung aller drei untersuchten Netzwerk-Parameter. Medium 4 war bei (fast) allen untersuchten Parametern statistisch signifikant besser im Vergleich zu Medium 1-3.

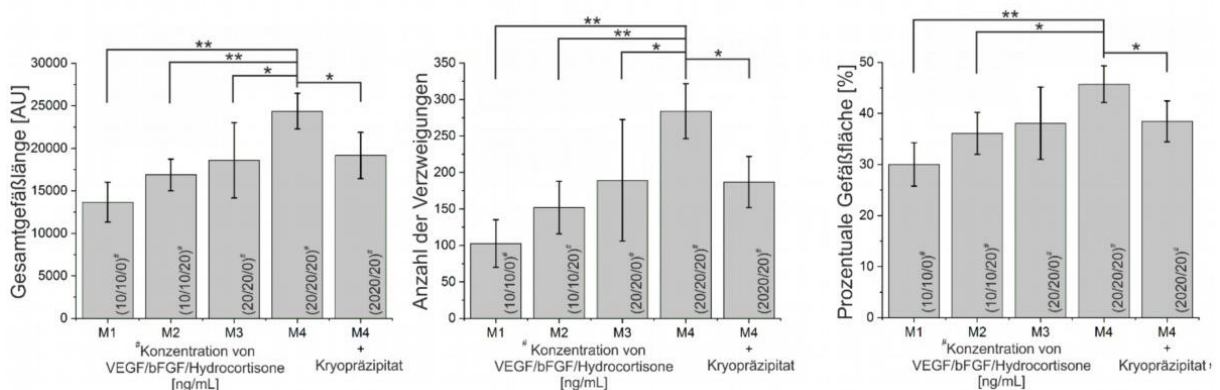


Abbildung 25: Ergebnisse der Netzwerkanalyse mittels AngioTool. Die Auswirkungen der Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Hydrocortison im Zellkulturmedium wurden nach sieben Tagen Kultivierung von 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* mittels AngioTool analysiert. Untersucht wurden: Medium 1 mit 10 ng/mL VEGF und bFGF, Medium 2 mit 10 ng/mL VEGF und bFGF und 20 ng/mL Hydrocortison, Medium 3 mit 20 ng/mL VEGF und bFGF und Medium 4 mit 20 ng/mL VEGF und bFGF und 20 ng/mL Hydrocortison. Ebenfalls wurde die Auswirkung der Verwendung von Kryopräzipitat in Kombination mit Medium 4 im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Fibrinogen untersucht.

Die Verwendung von Kryopräzipitat zur Beschichtung der *Scaffolds* während der Besiedelung anschließenden Kultivierung mit Medium 4 führte ebenfalls zu einer guten Netzwerkbildung (Abbildung 26), diese ist allerdings geringer als bei der Verwendung von kommerziell erhältlichem Fibrinogen. Nach statistischer Auswertung zeigte sich eine signifikant verringerte Netzwerkbildung im Vergleich zur Verwendung von kommerziell erhältlichem Fibrinogen (Abbildung 26).

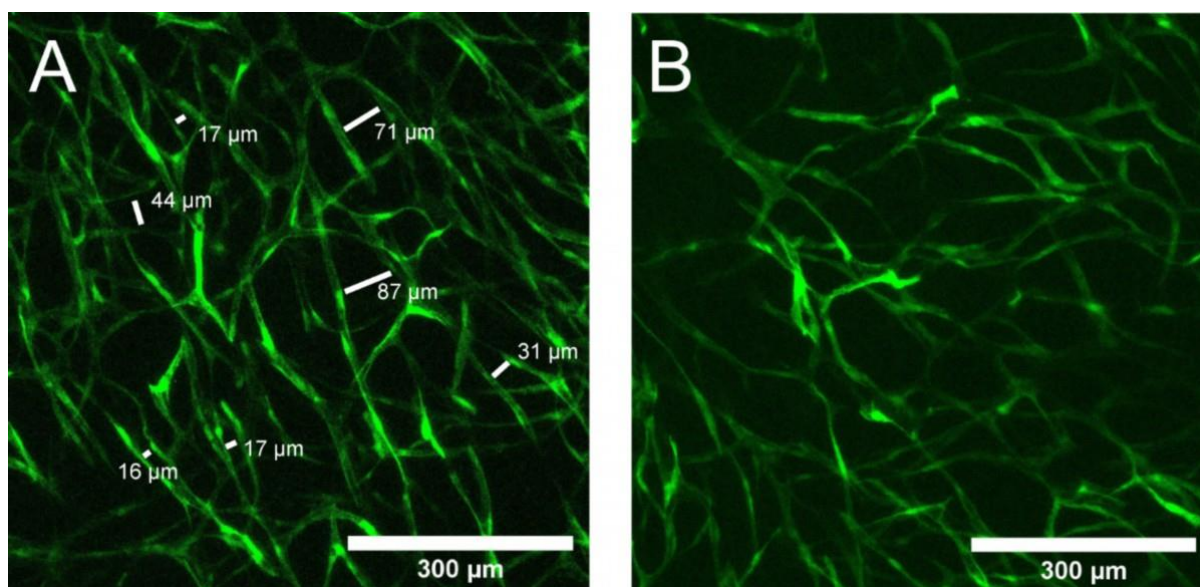


Abbildung 26: Vergleich der Netzwerkbildung auf PDO-Scaffolds nach Beschichtung mit kommerziell erhältlichem Fibrinogen oder Kryopräzipitat und Abschätzung des Abstandes der einzelnen Stränge. Die Auswirkung der Verwendung von Kryopräzipitat mit Medium 4 (B) im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Fibrinogen (A) auf die Netzwerkbildung von HUVECs in Kokultur mit MSCs (100.000:150:000) wurde nach sieben Tagen Kultivierung untersucht. Zusätzlich wurde eine Abschätzung des Abstandes der einzelnen Stränge in der Projektion vorgenommen.

4.2.8 Abstandsmessung der Netzwerkstrukturen

Für eine erfolgreiche Vaskularisierung der *Scaffolds* ist eine hohe Dichte der Netzwerkstrukturen entscheidend. In einer 2D-Projektion wurde der Abstand der Stränge exemplarisch analysiert.

Die Projektion umfasst eine Gesamthöhe an Bildern von 200 µm. Zwischen den Strängen wurde in 2D ein maximaler Abstand von 87 µm gemessen, manche Stränge weisen nur einen Abstand von 16 µm oder weniger auf (Abbildung 26 A). Ausgehend von maximalem Abstand in der Höhe ergibt sich somit eine maximale Distanz der Netzwerkstrukturen von 218 µm zueinander.

4.2.9 Lumenverifikation mittels Dextran-Assay

Für eine erfolgreiche Vaskularisierung der *Scaffolds* ist es entscheidend, innerhalb der Netzwerkstrukturen ein Lumen zu erzeugen. Das Lumen wurde durch Anreicherung von

fluoreszenzmarkiertem Dextran nach 24 Stunden Inkubation im Zellkulturmedium von Tag sechs auf Tag sieben nachgewiesen.

Nach 24 Stunden Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Dextran konnte in weiten Teilen der Netzwerkstrukturen eine Anreicherung des Dextrans beobachtet werden. Durch Aufnahme eines z-Stapels und Visualisierung der Seitenansicht des Stapels konnte das Dextran innerhalb einer Netzwerkstruktur nachgewiesen werden (Abbildung 27). Die Querschnitte entlang der gelben Linien in Abbildung 27 lokalisiert das Dextran (rot) deutlich zwischen der durch die HUVECs verursachten Fluoreszenz (grün).

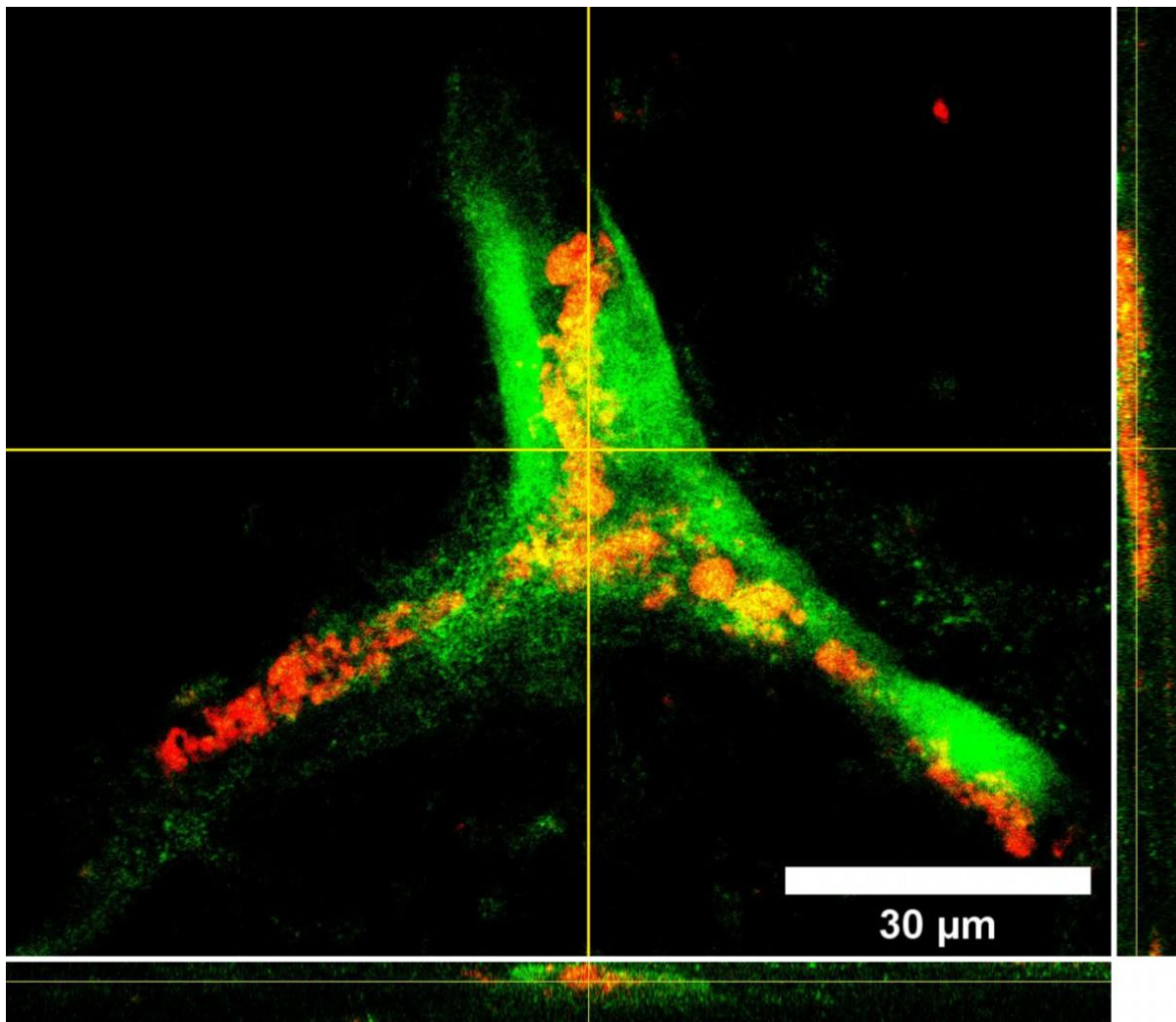


Abbildung 27: Verifikation des Lumens innerhalb der Netzwerkstrukturen mit Hilfe eines Dextran-Assays. Das Bild (eine 2D-Projektion eines z-Stapels) zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Netzwerkstrukturen (GFP-HUVECs, grün) auf einem *Scaffold* nach sieben Tagen Kultivierung. Von Tag sechs auf Tag sieben wurde fluoreszenzmarkiertes Dextran (Texas red, rot) zum Medium (hier Medium 4, siehe Abschnitt 8.3.3.5) hinzugefügt. Rechts und unterhalb der Projektion sind jeweils die Seitenansichten des z-Stapels entlang der gelben Linien dargestellt.

4.3 Charakterisierung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktorsystem

In den vorherigen Kapiteln wurden die Grundlagen zur Herstellung eines *Scaffolds* für eine bioartifizielle Gefäßprothese dargestellt. In diesem Kapitel soll nun ein speziell entwickeltes Bioreaktorsystem charakterisiert werden, um optimale Bedingungen für die Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese aufzuzeigen. Für die Endothelzellen, welche auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese angesiedelt werden sollen, ist es entscheidend, dass ein definierter Scherstress von bis zu 20 dyn/cm^2 angelegt werden kann, um die *in vivo* Bedingungen abzubilden und damit diese ein funktionelles Endothelium bilden (Lehoux et al. 2006; Papaioannou und Stefanadis 2005; Hahn und Schwartz 2009; Li et al. 2005).

Im ersten Abschnitt wird der Aufbau des Bioreaktorsystems dargestellt. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Charakterisierung des Bioreaktorsystems präsentiert und verschiedene Optimierungen bezüglich der Kultivierungsbedingungen gezeigt. Ein Teil der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse entstand im Rahmen der Masterarbeiten *Auswirkungen dynamischer Kultivierung von endothelialen Vorläufer-Zellen im Vergleich zu HUVECs auf EZM-Protein* von Gresa Hasani und *Entwicklung einer Kultivierungsstrategie zur Endothelialisierung einer 3D-Oberfläche* von Jannis Renzelmann.

4.3.1 Aufbau des Bioreaktorsystems

Der Aufbau des Bioreaktorsystems ist im Detail im Abschnitt 8.3.6.1 *Biorektoraufbau und Funktion* dargestellt. Der Gesamtaufbau ist schematisch in Abbildung 49 und als Foto in Abbildung 28 dargestellt. Für die folgenden Abschnitte ist relevant, dass das System aus zwei Fluidkreisläufen besteht, von denen einer durch die Gefäßprothese fließt und einer diese von außen mit Nährstoffen versorgt. Der innere Kreislauf muss für einen definierten, auf die innere Gefäßoberfläche wirkenden, Scherstress korrekt eingestellt werden. Hierfür kann extern ein Druck an die Pulschammer angelegt werden, um den Volumenstrom zu kontrollieren. Um eine korrekte Funktionsweise zu gewährleisten, wird sowohl der Druck, als auch der Volumenstrom im Bioreaktorsystem (Abbildung 29) gemessen. Zur Überwachung metabolischer Parameter können mittels eines FIA-Systems Proben genommen werden. Die technischen Details des Bioreaktorsystems können in Stanislawski *et al.* nachgelesen werden (Stanislawski et al. 2020).

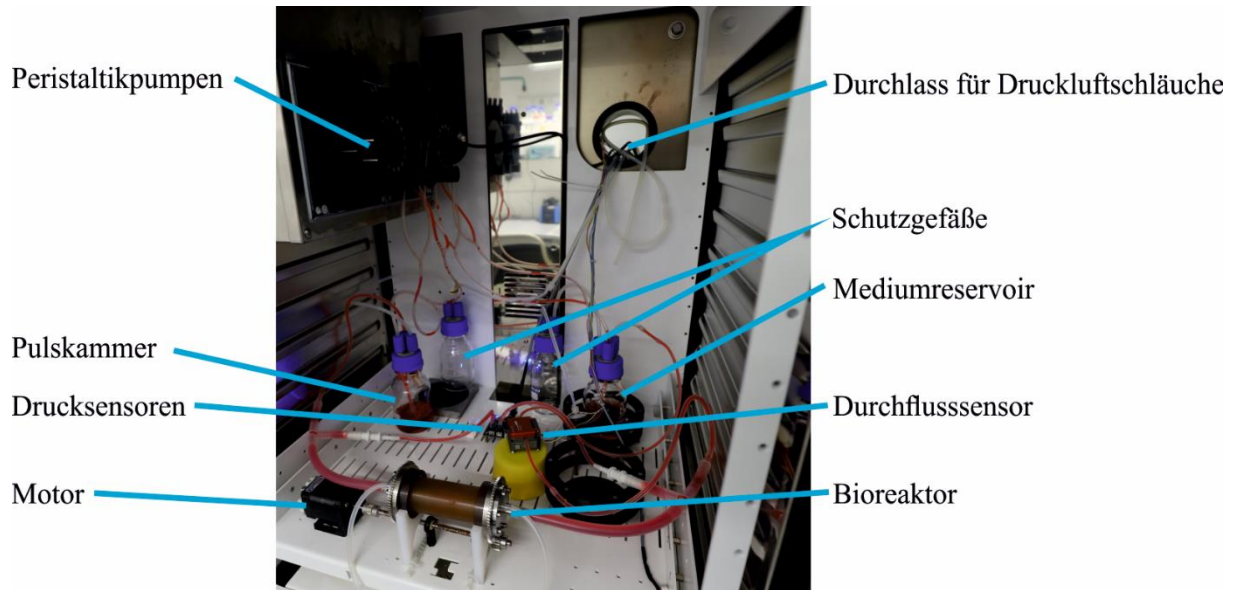


Abbildung 28: Foto des aufgebauten inneren Kreislaufs des Bioreaktorsystems. Das Foto zeigt den aufgebauten inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems im Inkubator.

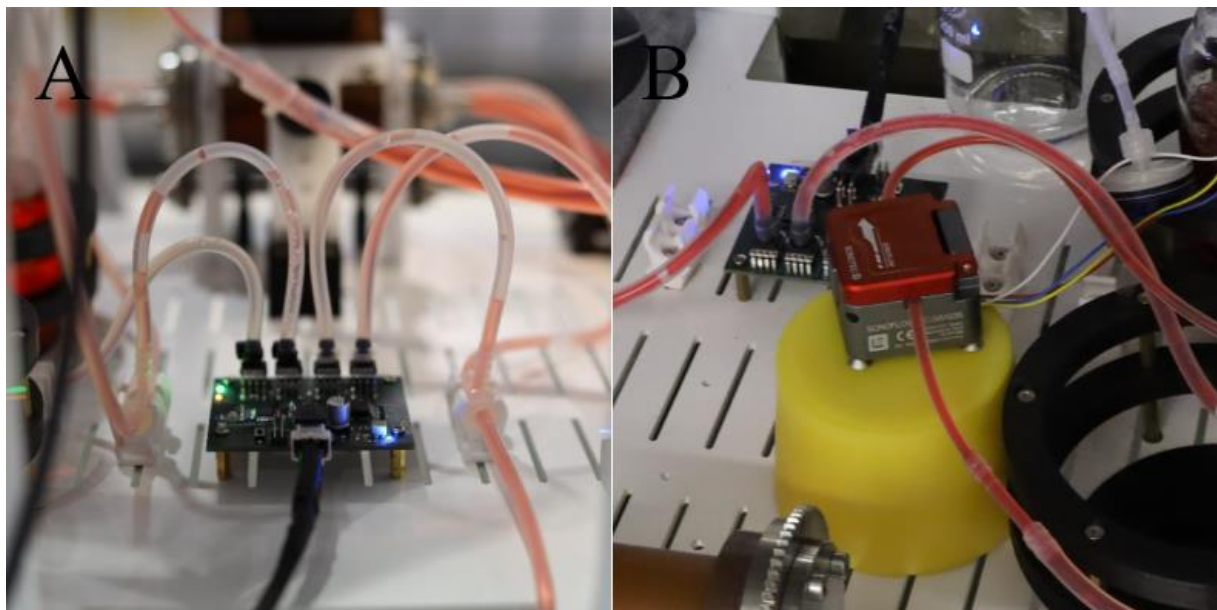


Abbildung 29: Drucksensoren und Ultraschall-Flusssensor. A: Mit dem Bioreaktorsystem verbundene Drucksensoren. B: Ultraschall-Flusssensor.

4.3.2 Optimierung der Viskosität des Zellkulturmediums durch Zugabe von Methylcellulose

Während der Kultivierung sollen die Endothelzellen auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese einem vorher bestimmten Scherstress ausgesetzt werden. Durch eine Erhöhung der Viskosität des Zellkulturmediums kann dieser bei gleicher Flussrate gesteigert werden. Um den wirkenden Scherstress im Voraus bestimmen zu können, wird ein Viskositätsmodell für das jeweils verwendete Zellkulturmedium benötigt. Hierfür wurde die Viskosität von EGM-2-

Zellkulturmedium nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Methylcellulose (MC) bei Scherraten zwischen 5 bis 1000 1/s mit einem Rotationsviskosimeter untersucht.

Die Zugabe von MC zum Zellkulturmedium führt zu einer höheren Viskosität der Lösung. Mit steigender Konzentration an Methylcellulose steigt die Viskosität der EGM-2/MC-Lösung weiter an, ebenso nimmt das scherverdünnende Verhalten der Lösung zu. Betrachtet man exemplarisch die Viskositätswerte bei einer Scherrate von 100, kann eine exponentielle Steigung der Viskosität beobachtet werden, diese kann mit der Formel

$$\text{Dyn. Viskosität} = 0,0014 * e^{1,0348 * \text{Scherrate}}$$

beschrieben werden.

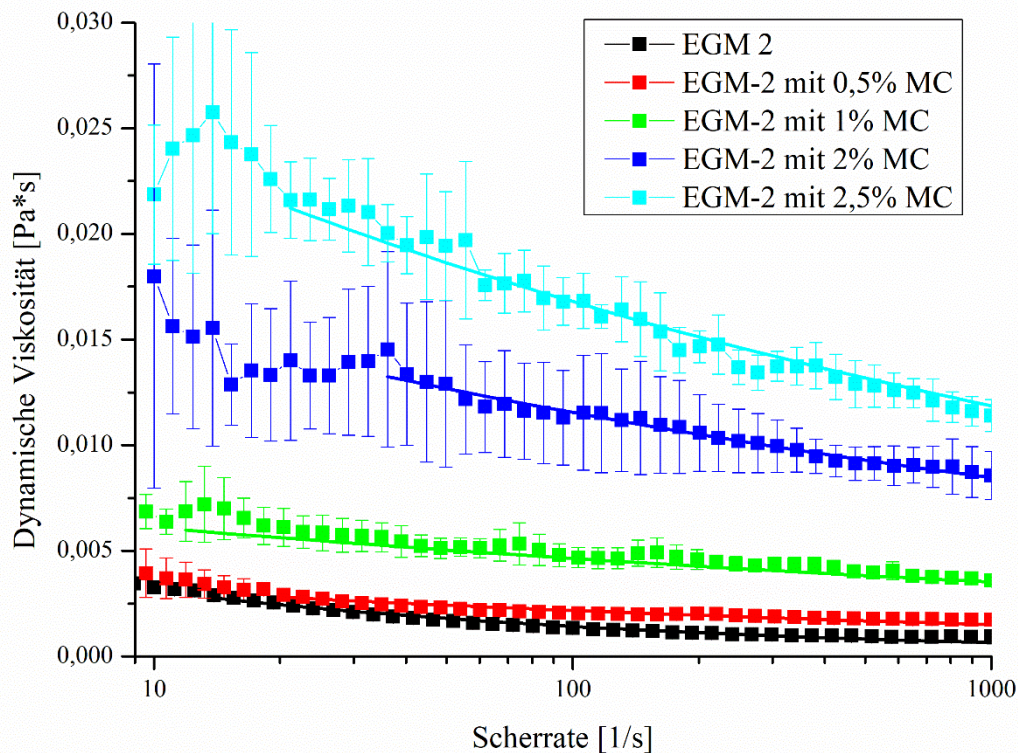


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Viskositätswerte für die verschiedenen EGM-2/MC-Lösungen und der darauf basierenden Potenzgesetz-Modelle für Nicht-Newtonsche Fluide. Für EGM-2, EGM-2 mit 0,5% MC, EGM-2 mit 1% MC, EGM-2 mit 2% und EGM-2 mit 2,5% MC wurde die Schubspannung bei Scherraten zwischen 5 bis 1000 1/s gemessen und die dynamische Viskosität berechnet. Auf Basis der Messwerte wurde jeweils ein Potenzgesetzmodell angepasst.

Auf Basis der Viskositätswerte wurden für jede EGM-2/MC-Lösung Parameter an ein Potenzgesetzmodell (siehe Methoden Abschnitt 8.3.6.4) zur Beschreibung Nicht-Newtonscher

Fluide angepasst. Die berechneten Parameter werden in Tabelle 3 gezeigt und die darauf basierenden Modelle sind in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

Tabelle 3: Berechnete Parameter für das Potenzgesetz-Modell. Auf Basis der gemessenen Viskositätswerte (Abbildung 30) für die verschiedenen EGM-2/MC-Lösungen wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell berechnet.

MC in EGM-2 [%]	Unteres Scherraten-Limit [1/s]	m	n
0	13,9	$0,672 \times 10^{-2}$	0,663
0,5	20,4	$0,452 \times 10^{-2}$	0,841
1	11,9	$0,803 \times 10^{-2}$	0,881
2	36,2	$2,151 \times 10^{-2}$	0,865
2,5	21,2	3.361×10^{-2}	0.8493

4.3.3 Messung der Verweilzeitverteilung

Für eine optimale Endothelialisierung ist es wichtig, dass der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese über die gesamte Länge des Gefäßes konstant ist. Im inneren Kreislauf der zentralen Bioreaktorkammer dürfen keine Toträume und Verwirbelungen entstehen. Zur Analyse wurde mit einem Dirac-Stoß ein Spurstoff (engl.: *Tracer*) oberhalb der zentralen Bioreaktorkammer injiziert und dessen Verteilung unterhalb der Kammer durch Messung der UV-Absorption analysiert. Bei der Analyse wurde die Verteilung sowohl bei verschiedenen Flussraten, als auch bei verschiedenen Viskositätswerten des Fluides untersucht. Aus der Verteilung wurde die mittlere Verweilzeit berechnet.

Bei allen gemessenen Absorptionskurven kann ein Peak beobachtet werden, wie er nach der Injektion eines *Tracers* mittels eines Dirac-Stoßes erwartet werden kann. Alle Peaks weisen ein leichtes *Tailing* auf. Die Verdopplung der Flussrate bei gleicher Viskosität des Fluides führte in etwa zu einer Halbierung der mittleren Verweilzeit (Abbildung 31). Bei 50 mL/min betrug die mittlere Verweilzeit 23,4 s, bei 100 mL/min 12,4 s und bei 200 mL/min 5,2 s. Nach spätestens 60 s war keine Absorption mehr zu messen, d.h. der gesamte Tracer hatte nach diesem Zeitraum die Messzelle passiert. Beim Vergleich der Verweilzeitverteilung bei unterschiedlicher Viskosität des Fluides und gleicher Flussrate von 200 mL/min ergab sich eine mittlere Verweilzeit von 3,3 mL/min für Wasser und 6,2 s für Wasser mit 1% MC. Die maximale Absorption war etwas niedriger für die Wasser/MC-Lösung im Vergleich zu Wasser,

wurde jedoch zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Ebenso kann ein stärkeres *Tailing* beobachtet werden.

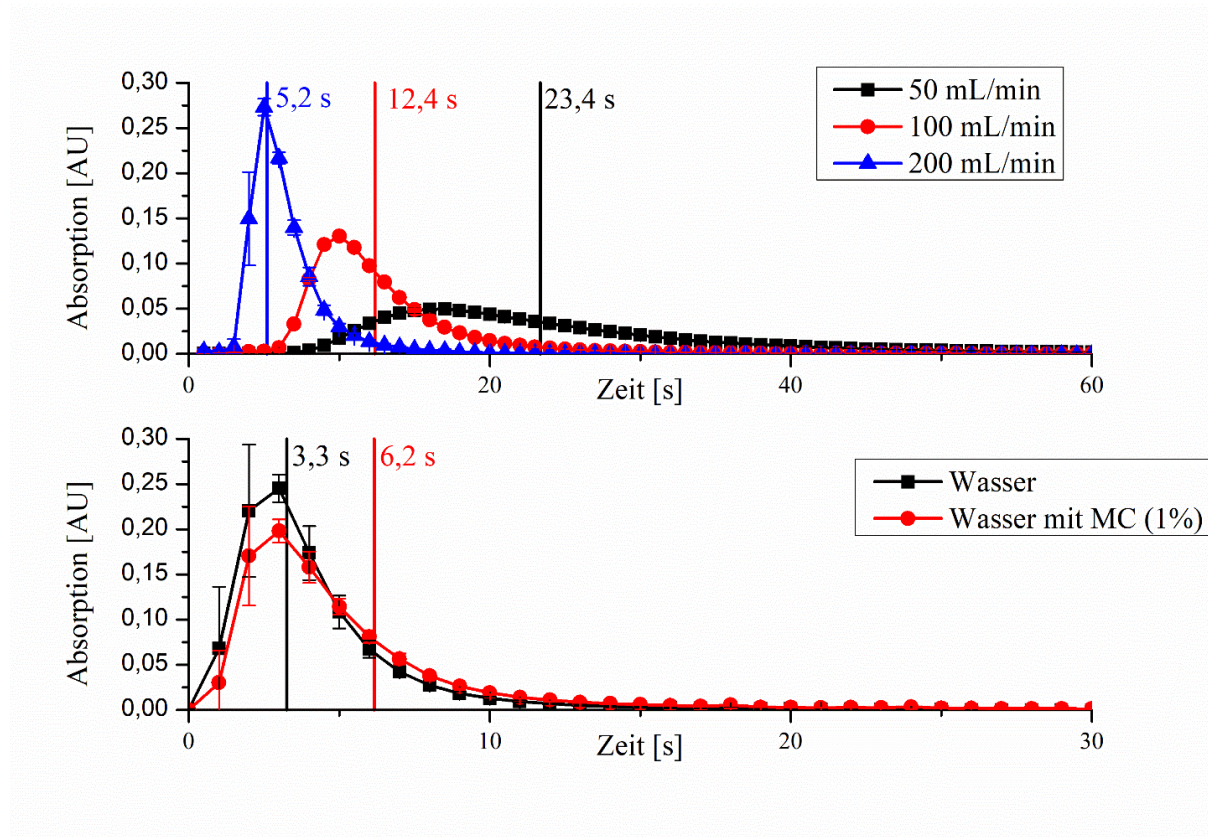


Abbildung 31: Normierte Verweilzeitverteilung und mittlere Verweilzeit bei unterschiedlicher Flussrate mit gleicher Viskosität und unterschiedlicher Viskosität mit gleicher Flussrate. Die Verweilzeitverteilung wurde im ersten Versuch bei Flussraten von 50 mL/min (schwarz), 100 mL/min (rot) und 200 mL/min (blau) gemessen (oben). Im zweiten Versuch wurde die Verweilzeitverteilung von Wasser (schwarz) und Wasser mit 1% MC (rot) bei einer Flussrate von 200 mL/min verglichen (unten). Aus den Absorptionskurven wurde jeweils die auf die Fläche der Kurve normierte Verweilzeitverteilung berechnet und anschließend die mittlere Verweilzeit bestimmt.

4.3.4 Analyse der Flussrate abhängig von der Druckdifferenz bei unterschiedlichen Viskositäten der Fluide

Der Einfluss der erhöhten Viskosität des Fluides auf die Leistung der Peristaltikpumpen und des Druck-Systems wurde im folgenden Versuch analysiert. Hierbei wurde die Druckdifferenz zwischen Pulschammer und Mediumreservoir des inneren Kreislaufs mit der aus der Druckdifferenz resultierenden Flussrate in Bezug gesetzt. Ebenso wurde die maximale Flussrate bei einer Druckdifferenz von 500 mbar und bei maximaler Leistung der Peristaltikpumpen untersucht.

Unabhängig von der Viskosität des untersuchten Fluides kann mittels der Peristaltikpumpen ein Volumen von 267,5 mL/min transportiert werden. Eine Druckdifferenz von 500 mbar resultiert für Wasser als Fluid in einer Flussrate von 550 mL/min, für Wasser mit 0,5% MC in einer

Flussrate von 498 mL/min und für Wasser mit 1% MC in einer Flussrate von 412 mL/min. Die aus spezifischen Druckunterschieden bis zu einer Differenz von 250 mbar resultierenden Flussraten für unterschiedliche Viskositäten sind in Abbildung 32 graphisch dargestellt. Bis zu einer Druckdifferenz von 100 mbar steigt die Flussrate für alle Fluide nicht linear an. Ab einer Druckdifferenz von 100 mbar steigt die Flussrate für Wasser pro 50 mbar Differenz um 60 mL/min, für Wasser mit 0,5% MC um 50 mL/min und für Wasser mit 1% MC um 40,5 mL/min. Ein erhöhter Basisdruck von 50 mbar oder 100 mbar im System hat, wie zu erwarten, keinen Einfluss auf die resultierende Flussrate.

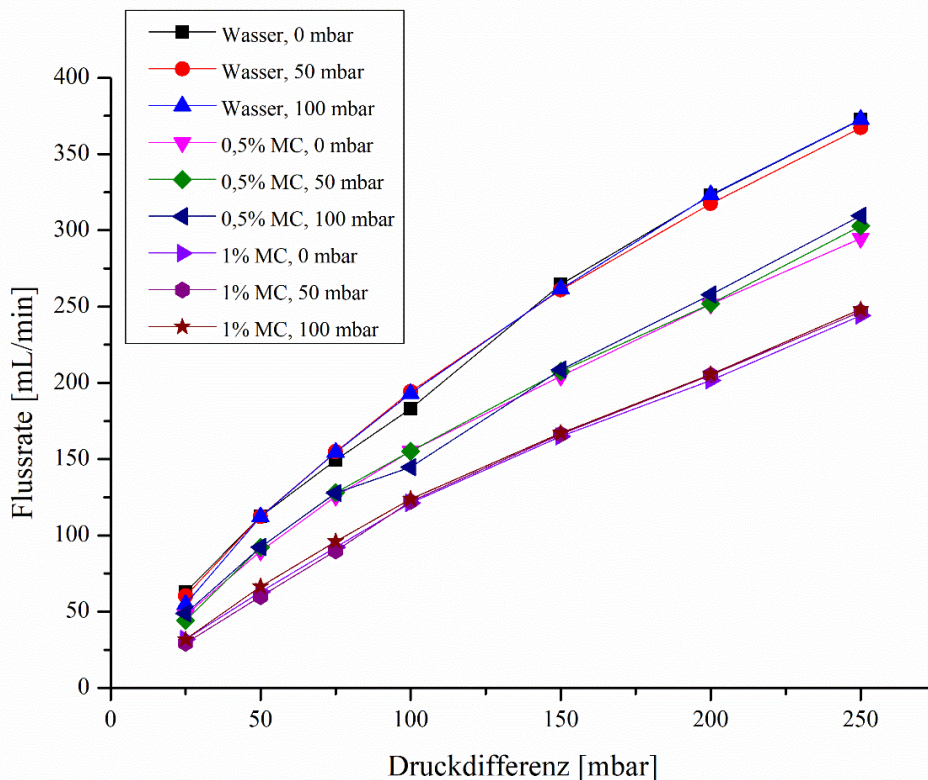


Abbildung 32: Graphische Darstellung der aus einer unterschiedlichen Druckdifferenz resultierenden Flussrate für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität. Für die drei Fluide Wasser, Wasser mit 0,5% MC und Wasser 1% MC wurde die aus verschiedenen Druckdifferenzen resultierende Flussrate gemessen. Hierfür wurden Druckdifferenzen bis 250 mbar analysiert. Zusätzlich wurde der Basisdruck im System 50 und 100 mbar erhöht.

4.3.5 Charakterisierung exemplarischer Druckprofile zur Kultivierung einer Gefäßprothese

Das Bioreaktorsystem ist über das angeschlossene Drucksystem in der Lage, ein pulsatile Druck- und Flussprofil im inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems zu erzeugen. Das pulsatile Druck- und Flussprofil kann einerseits dazu verwendet werden, die Stabilität der kultivierten Gefäßprothese unter extremer Belastung, wie z.B. hohem Druck, zu testen und andererseits hat

ein pulsatiler Fluss positive Auswirkungen auf die Bildung des Endotheliums auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese (Kraus et al. 2021).

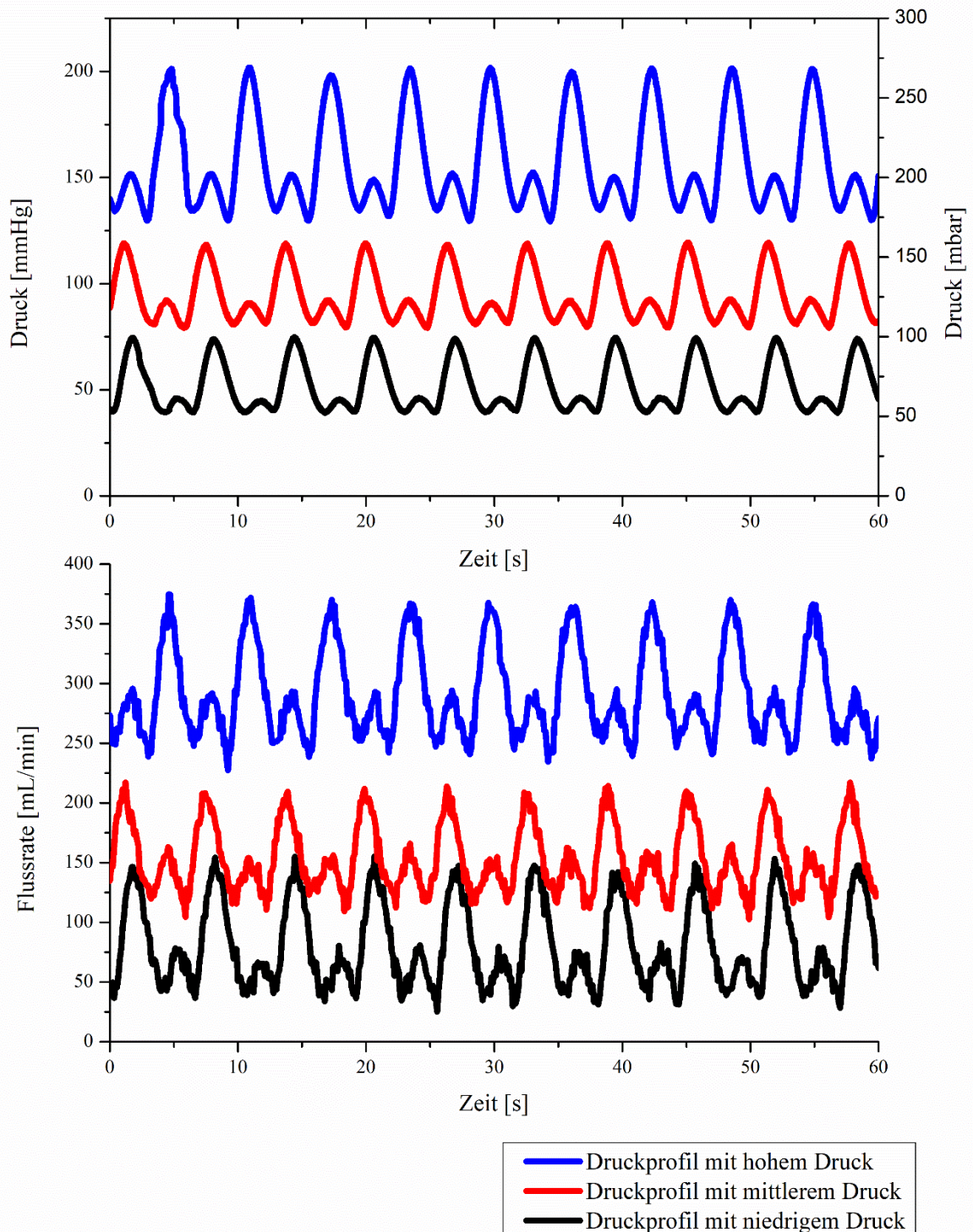


Abbildung 33: Exemplarische Druckprofile, die im Bioreaktorsystem angelegt werden können. Die drei exemplarisch erstellten Druckprofile repräsentieren ein hypotonisches (80/40 mmHg), ein normales (120/80 mmHg) und ein hypertonisches (200/130 mmHg) Druckprofil.

Exemplarisch wurden drei physiologische Druckprofile mit einem unterschiedlichem Druckniveau erstellt (Abbildung 33). Die drei Druckprofile repräsentieren ein hypotonisches Druckprofil (80/40 mmHg) mit einer mittleren Flussrate von 80 mL/min und einem mittleren Druck von 69 mbar, ein normales Druckprofil (120/80 mmHg) mit einer mittleren Flussrate von 153 mL/min und einem mittleren Druck von 125 mbar und ein hypertonisches Druckprofil (200/130 mmHg) mit einer mittleren Flussrate von 292 mL/min und einem mittleren Druck von 208 mbar. Für den pulsatilen Fluss gilt, dass im Mittel eine Flussrate von 267,5 mL/min nicht überschritten werden darf, da dieser Wert der maximalen Nachfüllrate des Druckgefäßes durch die Peristaltikpumpen entspricht.

4.3.6 Auswirkungen der Gefäßstruktur in der zentralen Bioreaktorkammer auf Druck und Flussrate beim Anlegen des exemplarischen, hypertonischen Druckprofils

Der Einfluss der Gefäßstruktur, welche in die zentrale Bioreaktorkammer eingesetzt ist, auf das in Abschnitt 4.3.5 etablierte exemplarische, hypertonische Druckprofil wurde durch Messen des Druckes und der Flussrate untersucht, um eventuelle Abweichungen zu identifizieren. Verglichen wurden drei Gefäßstrukturen: Ein Silikonschlauch, welcher zuvor schon als Standard für ein tubuläres Gefäß-*Scaffold* in den vorherigen Messungen verwendet wurde, eine 3D-gedruckte Röhre aus PCL und eine dezellularisierte Arterie eines Schweines. Alle Gefäßstrukturen hatten einen Innendurchmesser von ca. 8 mm.

Der höchste Druck innerhalb einer Periode des Pulses konnte für den Silikonschlauch gemessen werden, bei der 3D-gedruckten Röhre und der dezellularisierten Arterie war der maximal gemessene Druck leicht niedriger. Die gemessene Flussrate war bei der dezellularisierten Arterie leicht niedriger als bei dem Silikonschlauch und bei der 3D-gedruckten Röhre. Insgesamt lässt sich festhalten, dass kein wesentlicher Unterschied zu erkennen ist.

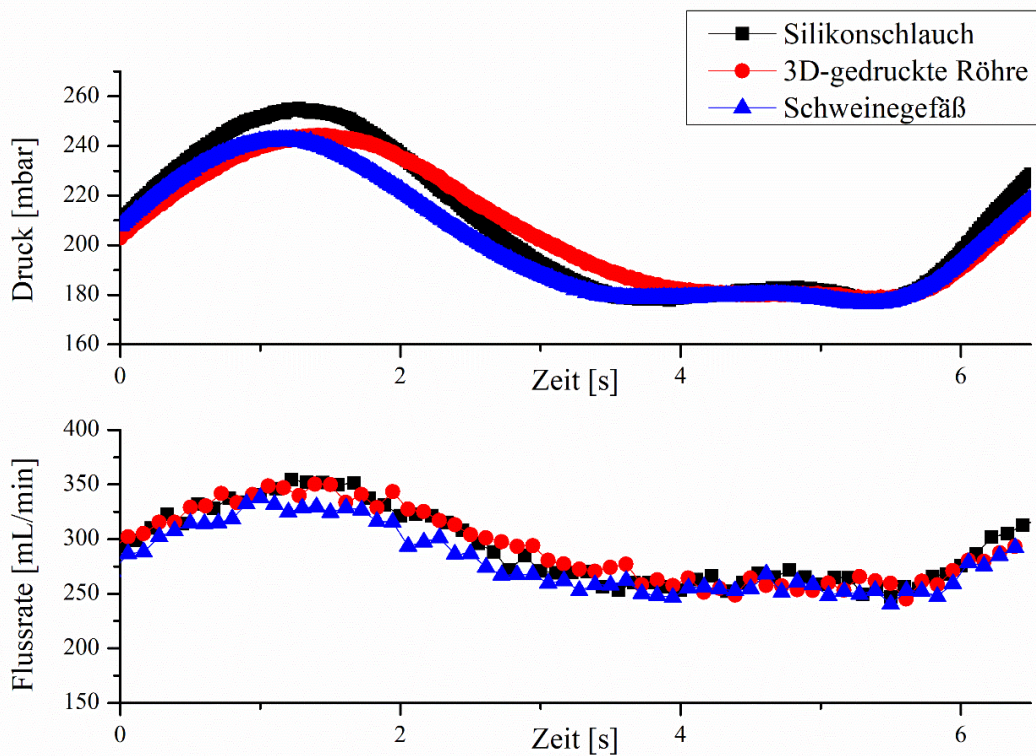


Abbildung 34: Vergleich des hypertonen Druckprofils bei unterschiedlichen Gefäßstrukturen. Der Druck und die Flussrate beim Anlegen des hypertonen Druckprofils (200/130 mmHg) wurden im inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems mit drei unterschiedlichen Gefäßstrukturen gemessen. Als unterschiedliche Gefäßstrukturen wurden ein Silikonschlauch, eine 3D-gedruckte Röhre und eine Arterie aus einem Schwein in die zentrale Bioreaktorkammer eingesetzt.

4.3.7 Analyse des resultierenden Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese mittels numerischer Strömungsanalyse

Der im Bioreaktor auf die Gefäßprothese wirkende Scherstress wurde mittels numerischer Strömungsanalyse mit dem Programm COMSOL Multiphysics sowohl bei konstanten Flussraten als auch bei einem exemplarischen pulsatilen Fluss untersucht. Zusätzlich wurde die Viskosität des simulierten Fluides auf Basis der in Abschnitt 4.3.2 erstellten Viskositätsmodelle angepasst.

4.3.7.1 Simulierter Scherstress bei konstanter Flussrate

Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese wurde mittels numerischer Strömungsanalyse für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität bei konstanten Flussraten bis zu 500 mL/min simuliert (Abbildung 35). Zur Beschreibung der Viskosität wurde ein Potenzgesetz-Modell mit den in

Tabelle 3 dargestellten Parametern auf Basis der Viskositätsmessungen von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen an MC in der Simulation verwendet.

Die Verwendung von MC zur Erhöhung der Viskosität des Zellkulturmediums führt zu einem deutlich erhöhten Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese. Die Zugabe von 0,5% MC führt zu einer Erhöhung des Scherstress um den Faktor 2,9 im Vergleich zu EGM-2 ohne MC, 1% MC erhöht den Scherstress um den Faktor 6,2, 2% MC erhöht den Scherstress um den Faktor 16,4 und 2,5% MC erhöht den Scherstress um den Faktor 22,4.

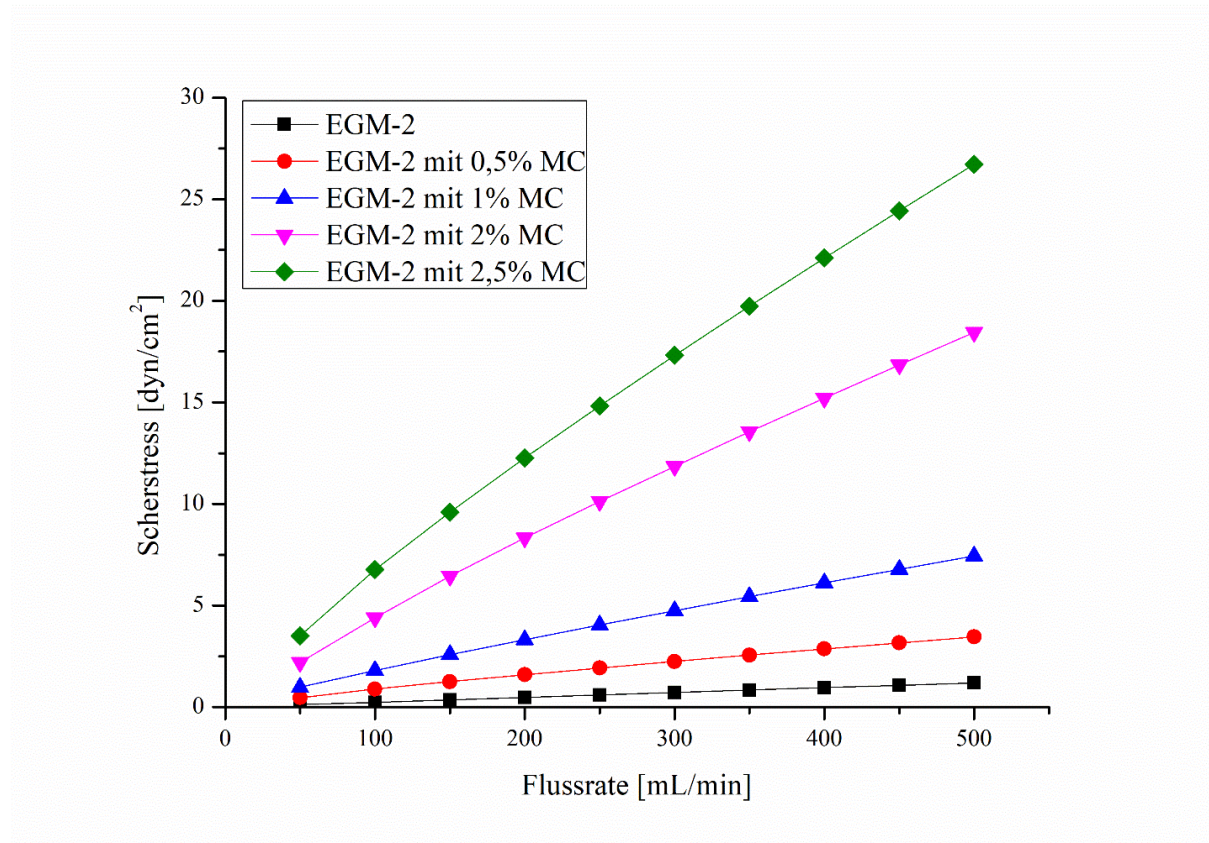


Abbildung 35: Simulation des Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese als Funktion der Flussraten für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität. Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese als Funktion der Flussrate wurde mit COMSOL Multiphysics für verschiedene Viskositäten simuliert. Dabei wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell aus Tabelle 3 zur Beschreibung der Viskosität von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen von MC verwendet.

4.3.7.2 Simulierter Scherstress bei pulsatiler Flussrate

Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese wurde mittels numerischer Strömungsanalyse für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität bei einer pulsatilen Flussrate bestimmt (Abbildung 36). Zur Beschreibung der Viskosität wurde ein Potenzgesetz-Modell mit den in

Tabelle 3 dargestellten Parametern auf Basis der Viskositätsmessungen von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen an MC in der Simulation verwendet. Als Basis für die pulsatilen Flussprofile wurden exemplarisch die korrespondierenden Druckwerte zu den normalen und hypertonen Druckprofilen aus Abschnitt 4.3.5 verwendet.

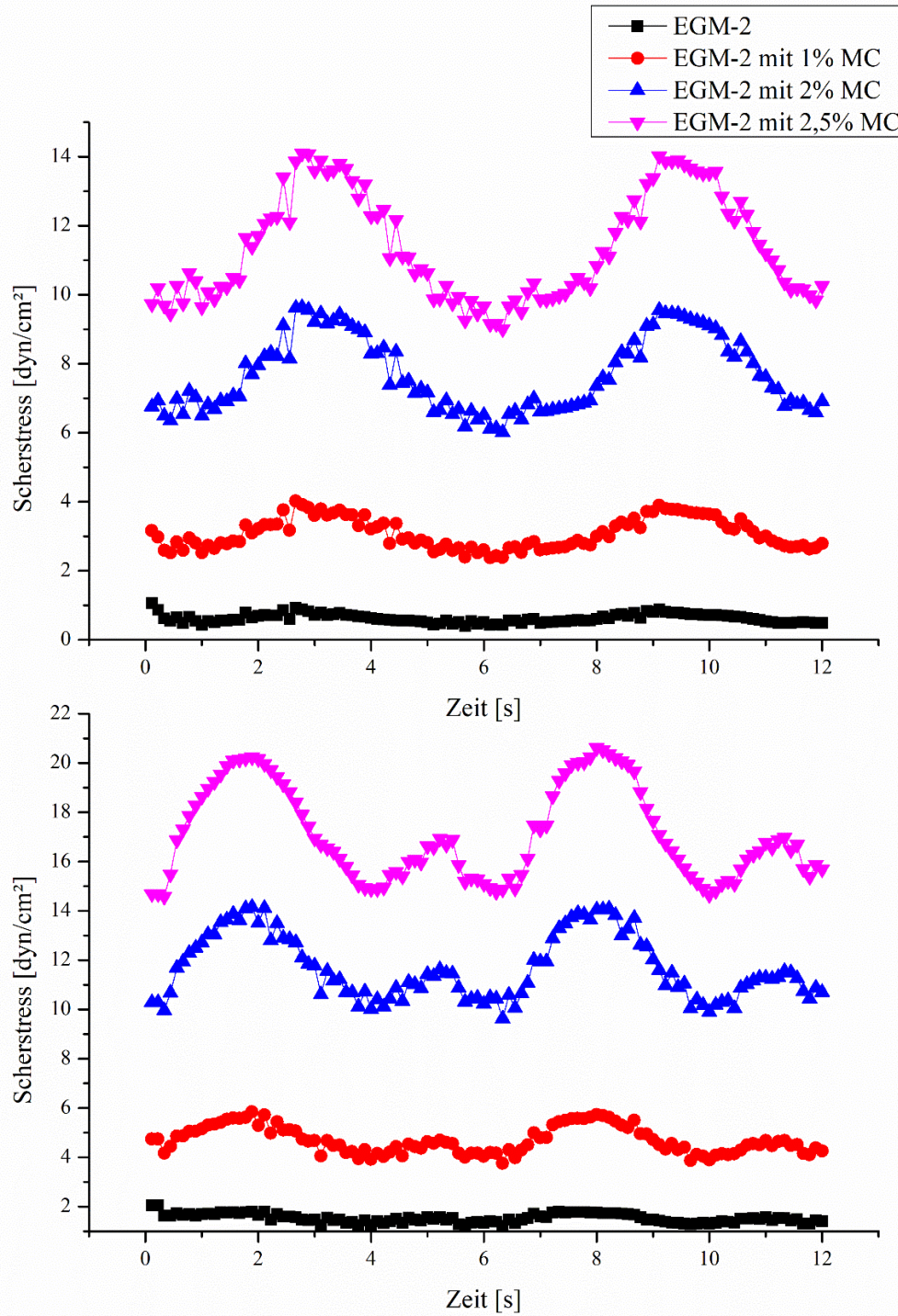


Abbildung 36: Simulierter Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese als Funktion der Zeit bei einem Flussprofil auf Basis eines normalen und hypertensiven Druckprofils für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität. Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese wurde mit COMSOL Multiphysics für ein Druckprofil auf Basis des normalen Druckprofils (oben) und des hypertensiven Druckprofils (unten) aus Abschnitt 4.3.5 berechnet. Dabei wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell aus Tabelle 3 zur Beschreibung der Viskosität von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen von MC verwendet.

Wenn das normale Druckprofil als Basis in der Simulation verwendet wird, ergibt sich für EGM-2-Zellkulturmedium ein maximaler Scherstress von $1,1 \text{ dyn/cm}^2$. Durch die Zugabe von 2,5% MC könnte der Scherstress auf $14,1 \text{ dyn/cm}^2$ gesteigert werden. Der Verwendung des hypertonischen Flussprofils als Basis in der Simulation führt mit EGM-2-Zellkulturmedium zu einem Scherstress von 2 dyn/cm^2 , wird das Medium zusätzlich mit 2,5% MC versetzt, könnte ein maximaler Scherstress von $20,6 \text{ dyn/cm}^2$ erreicht werden.

4.3.8 Evaluation des FIA-Systems am Beispiel der Glukoseanalytik

Mit Hilfe des FIA-Systems sollen während der Kultivierung regelmäßig sterile Proben aus dem Bioreaktorsystem entnommen werden und der Zellstoffwechsel während der Kultivierung somit überwacht werden. Für die Evaluierung der Funktion des FIA-Systems wurde das FIA-System für einen ersten Versuch mit einer dynamischen Kultivierung von HUVECs auf Flowslides verbunden. Hierbei wurde mittels des Systems täglich eine Probe von $500 \mu\text{L}$ aus dem Medienkreislauf entnommen. In einem zweiten Test wurden Glukose-Lösungen mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mM}$, 1 mM , $2,5 \text{ mM}$, 5 mM , 10 mM und 25 mM mit dem Glukose-Sensor vermessen, welcher später in das FIA-System integriert werden soll.

Während der Kultivierung wurden erfolgreich täglich Proben mit dem FIA-System aus dem Mediumkreislauf der dynamischen Kultivierung entnommen. Es konnte keine Kontamination der Kultivierung festgestellt werden.

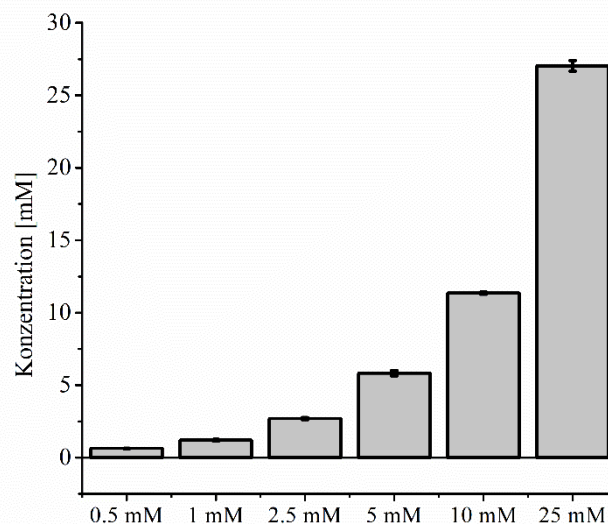


Abbildung 37: Glukosemessung zur Evaluation des FIA-Systems. Zur Evaluation des FIA-Systems und der Glukosesensoren wurden Glukose-Lösungen mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mM}$, 1 mM , $2,5 \text{ mM}$, 5 mM , 10 mM und 25 mM vermessen.

Die Mittelwerte der durch den Glukose-Sensor gemessenen Glukose-Konzentrationen lagen für Konzentrationen von 2,5 mM bis 25 mM innerhalb des Bereichs der tatsächlichen Konzentration mit einer Abweichung von unter 10%. Bei einer Konzentration von unter 0,5 mM stieg die Abweichung auf 27,7% an.

4.4 Kultivierungskontrolle einer tubulären Gefäßprothese im Bioreaktor

Nachdem im vorherigen Kapitel die Eigenschaften des Bioreaktorsystems charakterisiert worden sind, wird in diesem Kapitel die Funktionalität des Bioreaktorsystems zur Endothelialisierung der Gefäßprothese in einem kontrollierten Kultivierungsversuch untersucht. Die erfolgreiche Endothelialisierung ist entscheidend für die spätere Funktionalität der Prothese aufgrund der antithrombotischen Endothelfunktion (Wu und Thiagarajan 1996). Eine dezellularisierte Arterie aus dem Schwein (biotrics bioimplants AG, Berlin) wurde hierfür mit Endothelzellen mit einem dafür entwickelten Protokoll neu besiedelt. Die Kultivierung der Zellen wurde anschließend für sieben Tage im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen durchgeführt. Das Ziel war eine konfluente Einzelzellschicht der Endothelzellen auf der inneren Oberfläche der Arterie zu erreichen. Die Auswertung der Kultivierung im Bioreaktorsystem erfolgte durch die Erstellung von Paraffinschnitten der Arterie und Fluoreszenzfärbungen der inneren Oberfläche der Arterie. Als Maß für den Zellstoffwechsel, wurde der Glukoseverbrauch der Zellen nach der Kultivierung gemessen. Die Sterilität des späteren ATMP (= Advanced Therapy Medicinal Product), perspektivisch gedacht für die Implantation in Patienten, wurde anhand des Vorhandenseins einer Kontamination durch einen Sterilitätstest ausgeschlossen.

4.4.1 Besiedelungsstrategie für eine tubuläre Gefäßprothese

Eine effektive Strategie zur Besiedelung der Gefäßprothese ist entscheidend für eine erfolgreiche anschließende Kultivierung im entwickelten Bioreaktorsystem. Hierfür wird im ersten Schritt eine Gefäßprothese in der zentralen Bioreaktorkammer eingesetzt und die Kammer anschließend in vertikaler Position fixiert. Für die Besiedelung wurde folgendes Protokoll (graphisch dargestellt in Abbildung 38) entwickelt:

- A) Eine Zellsuspension aus HUVECs wird in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ HUVECs/mL vorbereitet und in einer 50 mL-Spritze aufgezogen.
- B) Die Zellsuspension wird mittels der Spritze langsam in den inneren Kreislauf der zentralen Bioreaktorkammer gefüllt. Parallel wird frisches, vortemperiertes Zellkulturmedium (37 °C) durch eine 50 mL-Spritze in den äußeren Kreislauf gefüllt. Entscheidend ist das gleichmäßige Befüllen, um einen starken Austausch des Mediums zwischen dem inneren und dem äußeren Kreislauf zu vermeiden. Nach dem Befüllen werden die Schläuche nahe der Kammer mit Klemmen verschlossen und mit dem restlichen Bioreaktorsystem verbunden. Das gesamte Bioreaktorsystem wird danach in den Inkubator überführt.

C) Die abgeschlossene, zentrale Bioreaktorkammer wird zuerst für sechs Stunden mit 5 RPM rotiert. Nach diesen sechs Stunden wird das Zellkulturmedium in der Kammer durch kurzes Öffnen der Klemmen an den Schläuchen und Anschalten der Pumpen mit Medium aus dem Mediumsreservoir des Bioreaktorsystems gewechselt. Nach 30 Sekunden werden die Pumpen deaktiviert und die Schläuche erneut abgeklemmt. Anschließend wird die Kammer für weitere 18 Stunden mit 5 RPM rotiert, bevor der Fluss des Zellkulturmediums für die Kultivierung gestartet wird.

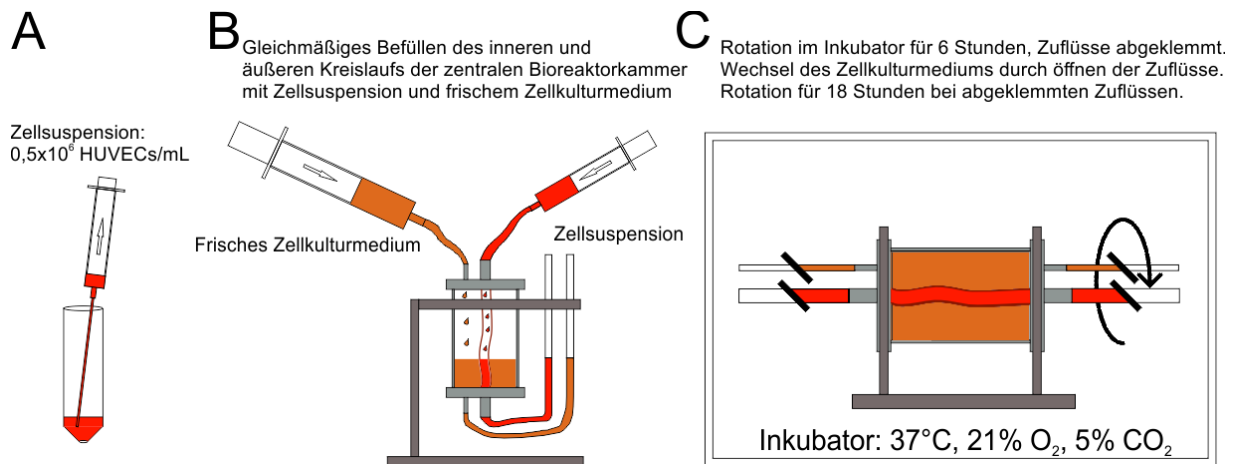


Abbildung 38: Besiedlungsstrategie für eine bioartifizielle Gefäßprothese als Vorbereitung der Kultivierung im entwickelten Bioreaktorsystem. Die Besiedelung der Gefäßprothese erfolgt in drei Schritten. A: Eine Zellsuspension (rot) mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ HUVECs/mL wird vorbereitet und in eine Spritze gefüllt. B: Parallel zur Befüllung des inneren Kreislaufs der zentralen Bioreaktorkammer mit der Zellsuspension wird der äußere Kreislauf mit frischem Zellkulturmedium (orange) gefüllt. C: Nach Einfüllen der Zellsuspension und des frischen Zellkulturmediums werden die an die zentrale Bioreaktorkammer angeschlossenen Schläuche abgeklemmt und die Bioreaktorkammer für sechs Stunden im Inkubator mit 5 RPM rotiert. Danach wird das Medium ausgetauscht und das Gefäß für weitere 18 Stunden rotiert.

4.4.2 Nachweis der Endothelialisierung der Gefäßprothese nach Besiedelung und Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem

Die erfolgreiche Endothelialisierung des Gefäßes wurde nach einer siebentägigen Kultivierung unter quasi-statischen Bedingungen im Bioreaktorsystem erreicht. Für diesen Prozess wurde eine dezellularisierte Arterie, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, in die zentrale Bioreaktorkammer eingesetzt und mit Endothelzellen besiedelt. Die Kultivierung wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Eine konstante Flussrate von 50 mL/min, einem Zellkulturmedium EGM-2 ohne Zusatz von MC (resultiert in $<0,5$ dyn/cm² Scherstress auf der inneren Gefäßoberfläche), das Zellkulturmedium enthielt 1 g/L Glukose und in einem Inkubator bei 21% pO₂ und 5% pCO₂ und einer Temperatur von 37 °C.

Durch die Verifikation einer konfluenten Einzelzellschicht mittels der Erstellung von Paraffinschnitten senkrecht zur Länge der Arterie und Fluoreszenzfärbungen der inneren Oberfläche der Arterie konnte dies nachgewiesen werden.

4.4.2.1 Nachweis einer Zellschicht auf der Gefäßoberfläche durch Auswertung von Paraffinschnitten

Die Verifikation einer konfluenten Einzelzellschicht wurde mit 5 µm dicken Paraffinschnitten des Gefäßes durchgeführt, diese wurden nach Präparation zur Visualisierung des Zytoplasmas und der Zellkerne mit H&E gefärbt.

Die Einzelzellschicht konnte durch Paraffinschnitte senkrecht zur Länge der Arterie und Fluoreszenzfärbungen der inneren Oberfläche gezeigt werden. Auf der Oberfläche des Gewebes können in regelmäßigen Abständen Zellkerne identifiziert werden (siehe Abbildung 39A, Zellkerne sind mit Kreisen indiziert). Im Vergleich können auf einem Schnitt, welcher von einem unbesiedelten Teil des Gefäßes stammt, keine Zellkerne an der Oberfläche identifiziert werden (siehe Abbildung 39B). Die Gewebeoberfläche des mit Zellen besiedelten Abschnittes erscheint ebenfalls deutlich glatter als die Oberfläche des unbesiedelten Abschnittes des Gefäßes.

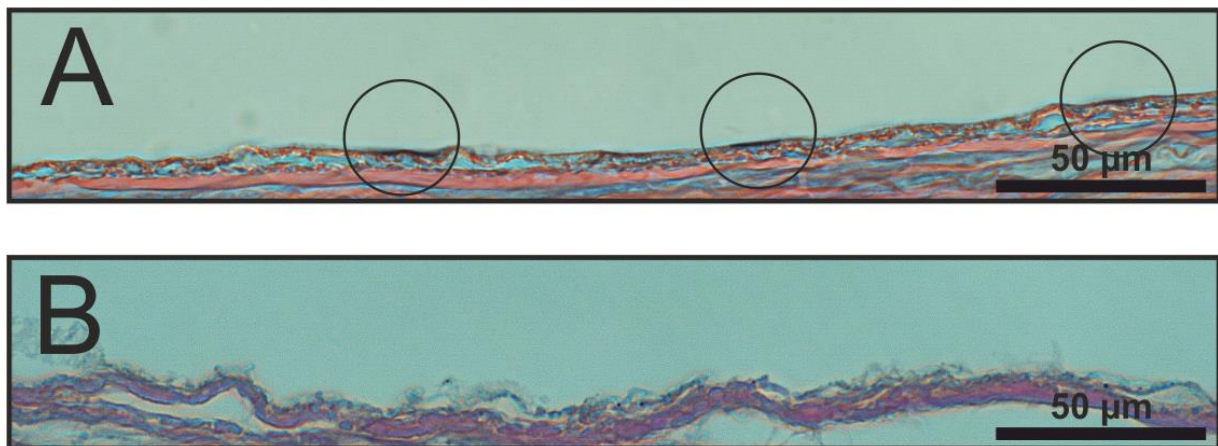


Abbildung 39: Phasenkontrastaufnahmen von Querschnitten der inneren Oberfläche des mit HUVECs rezellularisierten Gefäßes nach Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem. A: Besiedelter Abschnitt. B: Unbesiedelter Abschnitt. Die Kreise markieren sichtbare Zellkerne.

4.4.2.2 Fluoreszenzfärbungen der inneren Gefäßoberfläche

Eine konfluente Zellschicht auf der inneren Oberfläche des Gefäßes konnte ebenfalls mittels Fluoreszenzfärbungen der *Tunica Intima* nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Kombinationen aus Zellkernen und VE-Cadherinen, sowie Zellkernen und Zytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Sowohl durch die Färbung der VE-Cadherine (Abbildung 40), als auch durch die Färbung der Aktinfilamente (Abbildung 41) kann ein enger Zell-Zell-

Verbund der Endothelzellen auf der Gefäßoberfläche gezeigt werden. Es können insgesamt keine Lücken zwischen den Zellen identifiziert werden, somit kann von einer konfluenten Besiedelung der Gefäßoberfläche nach Kultivierung im Bioreaktorsystem ausgegangen werden. Die gefärbten Aktinfilamente weisen keine Ausrichtung in Flussrichtung nach quasi-statischer Kultivierung auf.

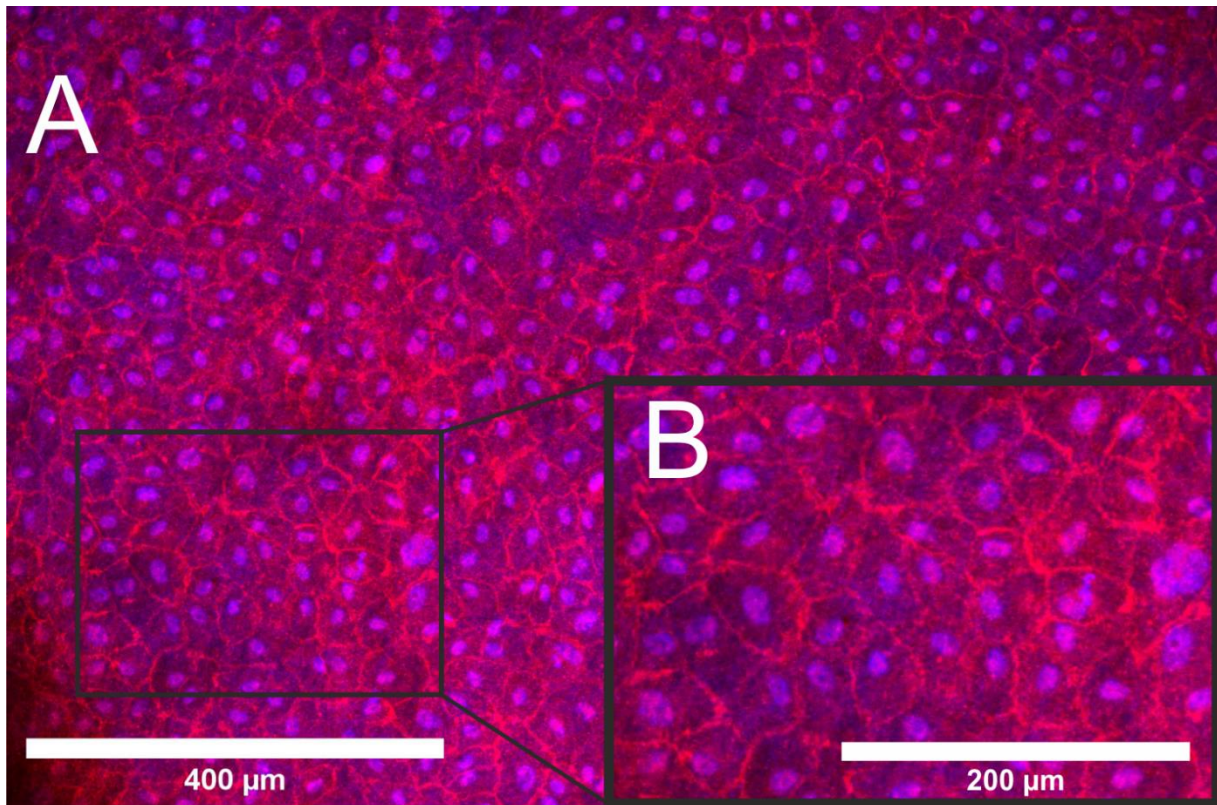


Abbildung 40: Fluoreszenzfärbung von fixierten HUVECs auf der inneren Gefäßoberfläche nach sieben Tagen Kultivierung im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen ($<0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Die Zellkerne (blau) sind mit Hoechst 33342 angefärbt und die VE-Cadherine (rot) sind mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. A: Übersichtsaufnahme der Gefäßoberfläche. B: Detailaufnahme der gefärbten Zell-Zell-Kontakte.

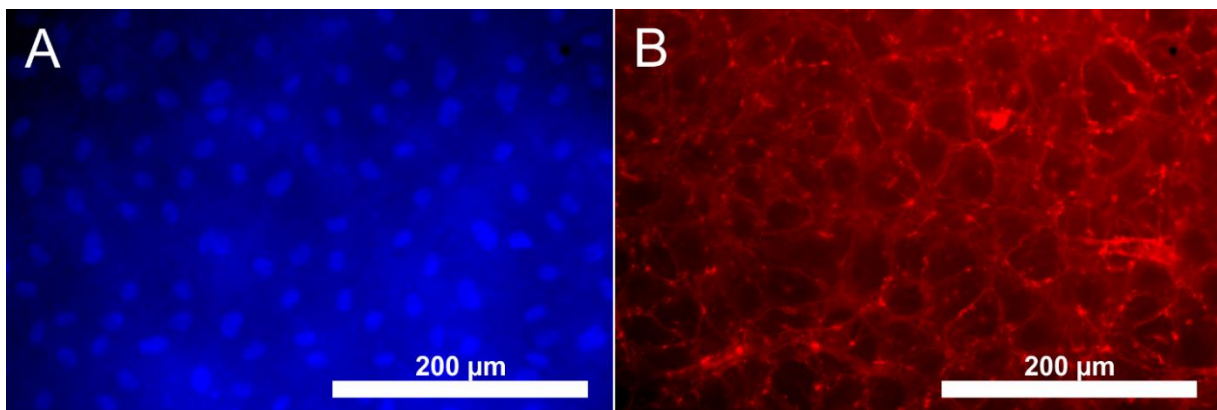


Abbildung 41: Fluoreszenzfärbung von fixierten HUVECs auf der inneren Gefäßoberfläche nach sieben Tagen Kultivierung im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen ($<0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Die Zellkerne (blau) sind mit Hoechst 33342 angefärbt und die Aktinfilamente (rot) sind mittels Phalloidin-iFluor visualisiert. A: Gefärbte Zellkerne. B: Markierte Aktinfilamente.

4.4.3 Glukoseverbrauch der Endothelzellen auf dem re-zellularisierten Gefäß während der Kultivierung im Bioreaktorsystem

Der Glukoseverbrauch der Endothelzellen, welche auf dem re-zellularisierten Gefäß angesiedelt wurden, wurde nach der siebentägigen Kultivierung im Bioreaktorsystem untersucht. Hierfür wurde eine nach Abschluss der Kultivierung aus dem Bioreaktorsystem entnommene Probe mit einer Standardlösung mit einer Glukosekonzentration von 1 g/L und frischem EGM-2-Zellkulturmedium verglichen. Die Messung wurde mit einem YSI 2950 Biochemistry Analyzer (YSI Inc.) durchgeführt. Für die aus dem Bioreaktorsystem entnommene Probe wurde eine Konzentration von 1,01 g/L ($\pm 0,078$ g/L) gemessen, für die Standard-Lösung eine Konzentration von 1,04 g/L ($\pm 0,015$ g/L) und für frisches EGM-2-Zellkulturmedium eine Konzentration von 1,01 g/L ($\pm 0,035$ g/L). Die Mittelwerte lassen sich aus statistischer Sicht mittels ANOVA ($\alpha=0,05$) nicht unterscheiden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass insgesamt nur wenig Glukose durch die Endothelzellen verbraucht worden ist.

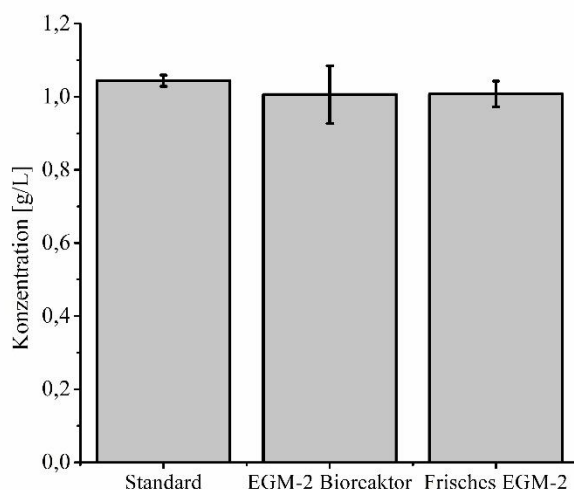


Abbildung 42: Messung der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums nach der Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem im Vergleich zu einer Standard-Lösung und frischem EGM-2 Zellkulturmedium. Die gemessene Glukosekonzentration der Proben beträgt: Standard-Lösung 1,04 g/L ($\pm 0,015$ g/L), Probe des EGM-2-Zellkulturmediums nach Kultivierung im Bioreaktorsystem 1,01 g/L ($\pm 0,078$ g/L), frisches EGM-2-Zellkulturmedium 1,01 g/L ($\pm 0,035$ g/L). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.4.4 Überprüfung des Zellkulturmediums auf eine bakterielle Kontamination nach Kultivierung im Bioreaktorsystem

Nach der durchgeführten siebentägigen Kultivierung des re-zellularisierten Gefäßes im Bioreaktorsystem wurde das verwendete EGM-2-Zellkulturmedium auf eine bakterielle Kontamination hin untersucht. Hierfür wurden zwei Proben des nach Abschluss der

Kultivierung entnommenen Zellkulturmediums mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle mittels qPCR untersucht und verglichen (Abbildung 44). Das relative Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im ROX-Kanal (rot) zeigt für alle analysierten Proben einen exponentiellen Anstieg ab dem 22. Zyklus, daher kann von einer erfolgreich durchgeführten qPCR ausgegangen werden. Ein verstärkt ansteigendes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal (grün), welches eine bakterielle Kontamination nachweist, kann ab dem 22. Zyklus nur für die Positiv-Kontrolle beobachtet werden. Während der Besiedelung des Gefäßes und der Kultivierung im Bioreaktorsystem ist es somit zu keiner bakteriellen Kontamination des im Reaktorsystem zirkulierenden Zellkulturmediums gekommen.

4.4.5 Kultivierungsstrategie für eine bioartifizielle Gefäßprothese: Zusammenfassung

Die Kultivierung einer bioartifiziell hergestellten Gefäßprothese kann in vier Abschnitte unterteilt werden:

A) Vorüberlegung der Kultivierungsbedingungen

Es erfolgt die Festlegung des notwendigen Scherstresses, welcher während der Kultivierung erreicht werden soll. Hierfür muss mit Hilfe der Simulationen für eine Kultivierung ein Flussprofil konzipiert werden (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36 in Abschnitt 4.3.7) und das Zellkulturmedium durch Zugabe von MC auf die gewünschte Viskosität gebracht werden (siehe Abbildung 30 in Abschnitt 4.3.2).

Exemplarisch ist in Tabelle 4 eine Strategie zum Erreichen eines Scherstresses von 5 dyn/cm^2 dargestellt. Hierfür wird eine MC/EGM-2-Lösung als Medium mit 1% MC verwendet.

B) Vorbereitung des Bioreaktorsystems

Vor der Kultivierung sollten zuerst alle Sensoren auf Funktion überprüft werden und ggf. kalibriert werden. Anschließend müssen alle Komponenten des Bioreaktorsystems sorgfältig gereinigt und auf Verschleißspuren (insbesondere bei den Schläuchen der Peristaltikpumpen) überprüft werden (siehe Methoden Abschnitt 8.3.6.1). Danach werden alle Komponenten autoklaviert (2 bar, $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min). Nach der Sterilisation müssen die Schläuche verbunden und als Verbund erneut autoklaviert werden.

C) Einsetzen und Besiedelung der Gefäßprothese

Vor der Besiedelung der Gefäßprothese mit Endothelzellen auf der inneren Oberfläche müssen diese zunächst expandiert werden (siehe Methoden Abschnitt 8.3.2.1). Es wird eine

Gesamtzellzahl von $13 \cdot 10^6$ Zellen (HUVECs) benötigt. Die Besiedelung erfolgt nach dem in Abschnitt 4.4.1 dargestellten Protokoll unter einer Sterilbank. Hierfür wird das Bioreaktorsystem final zusammen gebaut und mit 500 mL Zellkulturmedium (300 mL für den inneren Kreislauf, 200 mL für den äußeren Kreislauf) gefüllt.

D) Kultivierung im Bioreaktorsystem

Nach erfolgter Besiedelung inklusive einer Anwuchsphase von 24 h können die Flussrate und der Druck an die gewünschten Belastungswerte für die Kultivierung angepasst werden. Während das System läuft, muss in regelmäßigen Abständen (mindestens zweimal täglich) die korrekte Funktion des Systems überprüft werden:

- Überprüfung der Temperatur
- Überprüfung der pO_2 - und pCO_2 -Werte
- Überprüfung des Drucks und der Flussrate
- Überprüfung auf Akkumulation von Luftblasen und Entfernung dieser
- Überprüfung der Füllstände der Mediumreservoirs

Die Überprüfung erfolgt durch Analyse der aktuellen Daten von Flusssensor und Druckmesssystem am zugehörigen PC, der Graphen für Temperatur und Gasgehalt am Display des Inkubators und durch Öffnen des Inkubators und der manuellen Kontrolle der Schläuche auf Akkumulation von Luftblasen und der Füllstände der Reservoirs.

Tabelle 4: Exemplarische Einstellungen zum Erreichen eines Scherstress von 5 dyn/cm^2 während der Kultivierung einer Gefäßprothese. Während der Kultivierung wird Zellkulturmedium mit einem MC-Anteil von 1% verwendet.

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Scherstress</i>	<i>Flussrate</i>		<i>Druck [mbar]</i>	
		<i>[mL/min]</i>		<i>Drucksystem</i>	<i>Zentrifugalpumpe</i>
0 h	0 (statisch)	-	0	0	0
24 h	<0,5 dyn/cm^2 (quasi-statisch)	konstant	10-25	11	0,8
48 h	1,5 dyn/cm^2	konstant	83	34	1,7
60 h	2,5 dyn/cm^2	konstant	145	67	2,5
72 h	3,5 dyn/cm^2	konstant	210	113	3,7
84 h	4,5 dyn/cm^2	pulsatil	281	$= ((\sin(3t) \cdot 290) + 50)$	3,8
96 h	5 dyn/cm^2	pulsatil	320	$= ((\sin(3t) \cdot 450) + 50)$	4,5

5 Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung und Umsetzung verschiedener Strategien zur Herstellung und Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese in einem speziell entwickelten Bioreaktorsystem. Die Schritte zur Entwicklung und Herstellung wurden in dieser Arbeit in verschiedene Teilbereiche aufgeteilt: Die Herstellung und Charakterisierung eines geeigneten biohybriden *Scaffolds* aus PDO, einem synthetischen Polymer, und Fibrin, einem natürlichen Polymer, die Optimierung einer Methode zur Vaskularisierung des biohybriden *Scaffolds* mit Endothelzellen und mesenchymalen Stammzellen und die Charakterisierung eines für die Kultivierung der bioartifiziellen Gefäßprothese geeigneten Bioreaktorsystems inklusive einer ersten Kultivierung zur Überprüfung der Funktionalität des Systems. Bei einer solchen angestrebten bioartifiziellen Gefäßprothese handelt es sich um ein Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP, engl.: *advanced therapy medicinal products*) (PEI 2019). Aus diesem Grund wurde an einigen Stellen im Hinblick auf eine spätere Zulassung Wert auf die Übereinstimmung mit verschiedenen Normen und Standards der „guten Herstellungspraxis“ (GMP, engl.: *good manufacturing practice*) für ATMPs gelegt (European Commission 2017). In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Teilbereiche einzeln diskutiert und am Ende hinsichtlich der Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese zusammengefasst.

5.1 Scaffold-Herstellung und Analyse

Im ersten Abschnitt der Dissertation wurde die Eignung von PDO und Fibrin als Materialien für die *Scaffold*-Herstellung hinsichtlich einer bioartifiziellen Gefäßprothese analysiert sowie unterschiedliche Fertigungsmethoden für die *Scaffolds* evaluiert. *Scaffolds* bilden im *Tissue Engineering* die Gerüststruktur zur Besiedelung mit Zellen. Zu diesem Zweck müssen die hergestellten PDO-*Scaffolds* verschiedene Anforderungen erfüllen: Sie müssen biokompatibel sein, sie sollten biodegradierbar sein, ihre mechanischen Eigenschaften sollten denen des Zielgewebes entsprechen, der Aufbau des *Scaffolds* sollte die Funktion unterstützen und der Herstellungsprozess muss die Herstellung von *Scaffolds* in einem für spätere Zwecke geeigneten Maßstab und geforderter Qualität ermöglichen (Vergleich Abschnitt 3.7.1).

Für die Herstellung von *Scaffolds* aus PDO wurden zwei Verfahren etabliert, 3D-Druck und ein Salzlaugungsverfahren. Beide Verfahren sind für die Herstellung von *Scaffolds* im *Tissue Engineering* mit anderen Materialien etabliert (Tamay et al. 2019; Turnbull et al. 2018; Chen und Kawazoe 2016; Zhao et al. 2018). Mit den beiden eingesetzten Verfahren zur Herstellung von *Scaffolds* sollten zwei verschiedene Teilbereiche zur Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese untersucht werden. Hierbei sollte 3D-Druck als Verfahren zur Herstellung einer

tubulären Gerüststruktur eingesetzt werden, wohingegen das Salzlaugungsverfahren zur Herstellung eines feinporigen *Scaffolds* mit idealen Bedingungen zur Neubildung von Kapillaren, wie sie beispielsweise in der Wand großkalibriger Gefäße als „*vasa vasorum*“ vorkommen, eingesetzt werden sollte. Als Basis für eine Vaskularisierung mit Kapillargefäßen könnte dieses *Scaffold* generell im *Tissue Engineering* von Weichgewebe zu verwenden sein (siehe Abschnitt 5.2). Mit beiden Verfahren konnte das PDO erfolgreich verarbeitet werden.

5.1.1 Scaffold-Herstellung mittels 3D-Druck

Das Ziel der Verwendung von 3D-Druck als Methode zur *Scaffold*-Herstellung war die Produktion einer tubulären Struktur, welche später das Grundgerüst für die tubuläre Gefäßprothese bildet.

Die Herstellung von *Scaffolds* aus PDO mittels 3D-Druck konnte mit einer 0,1 mm großen Düse, welche die kleinstmögliche, standardmäßig und kommerziell verfügbare Größe für einen FDM-Drucker ist, bei einer Temperatur von 125 °C und einem Druck von 400 kPa erfolgreich umgesetzt werden. Die Verwendung von PDO für die Herstellung von *Scaffolds* ist meistens mit der Technik des Elektrosinnens verbunden (Hakimi et al. 2012; Boland et al. 2005; Kalfa et al. 2010), die Verwendung von 3D-Druck als Herstellungsmethode ist wenig verbreitet. In einem Ansatz zur Herstellung eines „kabelbinderartigen“ Konstruktes zur Verbindung vaskulären Gewebes aus PDO von Adolfsson *et al.* wurde im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Parametern eine deutlich höhere Temperatur von 165 °C verwendet (Adolfsson et al. 2021). Aufgrund der während der Verarbeitung des PDO mittels 3D-Druck festgestellten thermischen Degradation bei längerem Erhitzen über 30 min, sollte PDO immer bei der niedrigsten möglichen Temperatur verarbeitet werden (Boland et al. 2005). Durch die Degradation veränderte sich die Viskosität bei gleichbleibender Temperatur. Eine Änderung der physikalischen Eigenschaften nach Erhitzen durch spontane Polymerisation wurde auch durch Ahlinder *et al.* festgestellt (Ahlinder et al. 2018). Daher wäre die Verarbeitung mittels der in dieser Arbeit etablierten Temperatur von 125 °C im Vergleich zu 165 °C zu bevorzugen. Dennoch könnte die Verarbeitung mittels 3D-Druck dazu führen, dass es bei Strukturen, welche größer als die hier präsentierten Teststrukturen sind, zu einer Veränderung der Eigenschaften des PDOs während des Druckes kommt. Somit könnte im aktuell verwendeten Verfahren, in dem Pellets in einer Kartusche des Druckkopfes geschmolzen werden, keine gleichbleibende Qualität während eines längeren Druckprozesses gewährleistet werden. Der 3D-Druck-Prozess könnte durch die Verwendung eines Druckkopfes, welcher auf Filament basiert, entscheidend verbessert werden. Somit könnte die thermische Degradation reduziert werden, da immer nur

eine kleine Menge PDO an der Spitze des Filaments in der Düse geschmolzen wird. Hierfür wäre allerdings ein anderer 3D-Drucker notwendig, der über einen solchen Druckkopf verfügt.

In einem ersten Schritt der Strukturanalyse der 3D-gedruckten *Scaffolds* wurden die Oberfläche und der Aufbau untersucht (Abbildung 6). Hierfür wurden die Größe der 3D-gedruckten Stränge und der Abstand dieser zwischen einander untersucht.

Die durchschnittliche Dicke der 3D-gedruckten Stränge lag bei $153,11 \mu\text{m} \pm 7,69 \mu\text{m}$ und der Abstand der 3D-gedruckten *Scaffolds* betrug $167,03 \mu\text{m} \pm 4,34 \mu\text{m}$. Eine ähnliche Genauigkeit des 3D-Drucks wurde zum Beispiel auch von Liu *et al.* für den Druck eines PLLA-Komposits ermittelt mit Poren in der Größe von $520 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$ und $210 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$ (Liu et al. 2020). Hier ist der große Vorteil der Herstellung von *Scaffolds* durch 3D-Druck erkennbar, *Scaffolds* können durch die geringe Standardabweichung mit einer hohen strukturellen Komplexität reproduzierbar gefertigt werden (Tamay et al. 2019). Auf die Dicke der Stränge kann primär durch die Auswahl der Düse beim Drucken Einfluss genommen werden. Der Abstand der Stränge kann durch die vorher festgelegte Programmierung zur Herstellung des Objektes frei gewählt werden.

5.1.2 Scaffold-Herstellung durch Salzlaugung

Das Ziel der Verwendung eines Partikellaugungs-Verfahren zur *Scaffold*-Herstellung war die Herstellung einer feinporigen, schwammartigen Struktur, welche ideale Eigenschaften für das Einwachsen von Zellen bietet und eine gute Gerüststruktur für die Neubildung von Kapillaren und somit für eine spätere Vaskularisierung eines Gewebes ermöglicht. Ein vaskuläres Netzwerk in einem durch *Tissue Engineering* hergestellten Gewebe ist aufgrund der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen notwendig (Carmeliet und Jain 2000) und auch innerhalb der Wand von größeren Blutgefäßen wird ein Gefäßsystem, das *vasa vasorum*, benötigt (Ritman und Lerman 2007).

Die Herstellung von PDO-*Scaffolds* durch Salzlaugung wurde auf Basis eines ähnlichen Ansatzes zur Herstellung von porösen *Scaffolds* aus PLLA/PLGA von Levenberg *et al.* zur Integration in Weichgewebe angepasst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auf diese Art hergestellte PLLA/PLGA-*Scaffolds* exzellente Eigenschaften für das Einwachsen von Zellen und für die Kapillarbildung besitzen (Levenberg et al. 2002; Freiman et al. 2018). Die Verwendung von PDO für diese Art von *Scaffolds* stellt jedoch ein Novum dar. Andere Ansätze zur Herstellung von *Scaffolds* unter Einsatz eines Partikellaugungsverfahrens wurden zum Beispiel von Coogan *et al.* zur Erhöhung der Schwellfähigkeit von Hyaluronsäure-Hydrogelen

(Coogan et al. 2020) oder von Liang *et al.* zur Herstellung von porösen PLGA-*Scaffolds* zur Besiedelung mit osteogen differenzierten MSCs durchgeführt (Liang et al. 2018).

Für die Herstellung wurde das PDO in Hexafluorisopropanol in einer Konzentration von 0,05g/mL unter regelmäßigem Rühren gelöst. Die resultierende homogene Lösung wurde in eine Salz-gefüllte Form pipettiert (1,67 g Salz pro Milliliter PDO-Lösung). Nach Abdampfen des Hexafluorisopropanols wurde das Salz aus den hergestellten PDO/Salz-Blöcken durch Inkubation der Blöcke in Wasser herausgelöst (siehe Abschnitt 8.3.1.1.1).

In der Strukturanalyse der *Scaffolds* wurden zuerst die Oberfläche und der Aufbau untersucht (Abbildung 6). Zu diesem Zweck wurde die Porengröße der durch Salzlaugung entstandenen Poren ausgewertet. Für die Auswertung der Porengröße und der Porosität eines Stoffes sind je nach Porenstruktur verschiedene Verfahren möglich. Aufgrund der Partikelgröße handelt es sich bei den zu erwartenden Poren um Makroporen (>50 nm). Da Verfahren, wie Gasadsorption oder Quecksilberintrusion nur für kleinere Poren angewendet werden können und die *Scaffolds* selbst zu klein sind für eine Immersion in Wasser, wurde sich für eine Analyse der Poren an der *Scaffold*-Oberfläche durch Phasenkontrastmikroskopie sowie für einen μ CT-Scan zur Analyse der inneren Struktur entschieden (Tomlins et al. 2004; Anovitz und Cole 2015). Die μ CT wurde zum Beispiel erfolgreich zur Charakterisierung von Polyethylen-*Scaffolds* als Knochenersatz mit einer Porengröße zwischen 50-800 μ m angewendet (Senatov et al. 2020; Bulygina et al. 2020).

Die Größe der Poren an der *Scaffold*-Oberfläche der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* wurde durch Phasenkontrastmikroskopie ermittelt und betrug ca. $326,33 \mu\text{m} \pm 149,67 \mu\text{m}$. Mittels μ Ct konnte bei der Analyse der inneren Struktur ebenfalls eine hohe Interkonnektivität der Poren gezeigt werden sowie eine durchschnittliche Materialstärke der Wände von ca. $53,68 \mu\text{m} \pm 29,73 \mu\text{m}$. Eine Auswertung der Porengröße durch die μ Ct war aufgrund der hohen Interkonnektivität nicht möglich, da sich die Poren nicht klar definieren ließen. Hier war eine verhältnismäßig hohe Standardabweichung zu beobachten. Eine höhere Uniformität der Poren wäre bei Verwendung gleichmäßigerer Partikel möglich (Chen und Kawazoe 2016), grundsätzlich ist die Struktur aber eher chaotisch. Die Wandstärke der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* wäre im Gegensatz zur Porengröße nur schwer zu variieren. Die beiden Verfahren zur Analyse der Porenstruktur haben sich für die Analyse der PDO-*Scaffolds* bewährt.

Die Porengröße und die Interkonnektivität sind entscheidende Faktoren für das Einwachsen der Zellen in die *Scaffolds* (Rouwkema und Khademhosseini 2016). Sie haben Auswirkungen auf die zelluläre Adhäsion, die Viabilität, die Verteilung der Zellen, die Vaskularisierung und die Bildung der extrazellulären Matrix je nach Zelltyp (Zeltinger et al. 2001; O'Brien et al. 2005; Jafari et al. 2017). Beispielsweise konnte von Zhang *et al.* gezeigt werden, dass Poren mit einer Größe von 150-250 μm die Expression und Produktion von Typ II Kollagen und Aggrecan erhöhen und somit optimal für die Knorpelbildung sind (Zhang et al. 2014b). Murphy *et al.* konnten zeigen, dass eine Porengröße $>300 \mu\text{m}$ zu einer verbesserten Zellmigration von Osteoblasten führt (Murphy et al. 2010). Druecke *et al.* konnten nachweisen, dass die Vaskularisierung von *Scaffolds in vivo* bei einer Porengröße von 250-300 μm im Vergleich zu kleineren Poren signifikant erhöht war (Druecke et al. 2004). Ähnliches konnte auch von Feng *et al.* gezeigt werden, hier limitierten Poren $<400 \mu\text{m}$ das Wachstum von Blutgefäßen (Feng et al. 2011). Somit sollten die durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* eine optimale Porengröße für die Vaskularisierung des Gewebes bieten. Dies ist aufgrund der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen entscheidend für die spätere Funktionalität des Gewebes (Rouwkema und Khademhosseini 2016).

5.1.3 Überprüfung der Biokompatibilität

Obwohl die Biokompatibilität von PDO bekannt ist und das Material in der Chirurgie standardmäßig eingesetzt wird, wurde die Zytotoxizität eines Extraktes aus den durch 3D-Druck und Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* mit einem CTB-Assay untersucht, da die Herstellung der porösen *Scaffolds* durch Salzlaugung den Einsatz des Lösungsmittels Hexafluorisopropanol erfordert, welches eine potentiell negative Wirkung auf die Zellvitalität haben könnte (Abbildung 7). Die durch 3D-Druck hergestellten *Scaffolds* dienen hier als Vergleichsprobe. Für den Extrakt aus den 3D-gedruckten *Scaffolds* konnte in der höchsten Konzentration des Extraktes von 200 mg/mL eine Viabilität von $95,5\% \pm 3,3\%$ gemessen werden, im Vergleich dazu wurde für den Extrakt aus den durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* bei der höchsten Konzentration von 50 mg/mL eine Viabilität von $94,4\% \pm 2,9\%$ gemessen. Die Herstellung eines höher konzentrierten Extraktes aus letzteren *Scaffolds* war nicht möglich, da nicht mehr Flüssigkeit aus den *Scaffolds* nach der Inkubation extrahiert werden konnte. Nach DIN EN ISO 10993-5 zur Testung der *in vitro* Zytotoxizität von Medizinprodukten würde eine Viabilität von $<70\%$ als zytotoxisch eingestuft werden (Feinmechanik und Optik (NAFuO) 10993-5:2009). Somit können beide *Scaffolds* als nicht-zytotoxisch definiert werden.

5.1.4 Analyse der mechanischen Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften der hergestellten *Scaffolds* wurden durch Zugversuche analysiert. Hierbei wurden 3D-gedruckte Testkörper mit einem Auffüllgrad von 25% mit durch Salzlaugung hergestellten Testkörpern mit einer Porosität von ~73% verglichen. Theoretisch sollten beide Arten von Testkörpern somit eine ähnliche Porosität aufweisen. Vermutlich war die Materialdichte der 3D-gedruckten *Scaffolds* jedoch etwas höher als durch die Einstellung des Druckers vorgegeben. Für die 3D-gedruckten Testkörper wurde eine maximale Zugfestigkeit von 15,95 MPa ($\pm 2,24$ MPa) und ein Young's Modulus von 12,00 MPa ($\pm 1,81$ MPa) gemessen. Im Gegensatz dazu wiesen die durch Salzlaugung hergestellten Testkörper mit einer maximalen Zugfestigkeit von 0,142 MPa ($\pm 0,046$ MPa) und einem Young's Modulus von 1,054 MPa ($\pm 0,485$ MPa) deutlich niedrigere Werte auf. Somit waren nur ca. 9% der Kraft notwendig, um eine identische Dehnung der durch Salzlaugung hergestellten Testkörper wie bei den 3D-gedruckten Testkörpern zu erreichen. Im Vergleich der maximalen Zugfestigkeit ist der Wert der 3D-gedruckten Testkörper sogar um ca. 10.232% erhöht. Die Bruchdehnung von 24,3% ($\pm 1,31\%$) der durch Salzlaugung hergestellten Testkörper liegt allerdings ca. 51% höher als die der 3D-gedruckten Testkörper mit 16,1% ($\pm 2,01\%$). Der große Unterschied ist aufgrund der chaotischen Struktur der durch Salzlaugung hergestellten Testkörper nicht unerwartet. Vergleicht man diese ermittelten Werte mit Literaturwerten, welche für Nahtmaterial aus Polydioxanon gemessen wurden, ist zu erkennen, dass die Werte der Testkörper deutlich niedriger sind. Für das Nahtmaterial PDX (Kruise, Dänemark) wurde eine maximale Zugfestigkeit von 478,99 MPa und ein Young's Modulus von 1000,95 MPa bestimmt (Kreszinger et al. 2018). Bei diesem Vergleich muss allerdings beachtet werden, dass diese Werte für nicht-poröses Material ermittelt wurden, bei dem die Kraft gleichmäßig auf die gesamte Querschnittsfläche verteilt wird. Somit kommt es nicht zu vielen kleinen Einschnürungen, wie sie ab einer bestimmten Dehnung bei den durch Salzlaugung hergestellten Testkörpern auftreten und auch nicht zum Bruch an einer durch den 3D-Druck-Prozess entstandenen Schwachstelle der Testkörper. Für vergleichbare PDO-*Scaffolds*, welche durch Elektrosponnen hergestellt wurden, wurden je nach Faserdurchmesser (abhängig von der verwendeten PDO-Konzentration beim Elektrosponnen) und Faserorientierung von Boland *et al.* Werte für die maximale Zugfestigkeit von 1,7-12,1 MPa und den Young's Modulus 2-43,6 MPa festgestellt (Boland et al. 2005). Somit zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Teststrukturen Werte in der gleichen Größenordnung. Der Young's Modulus der durch Salzlaugung hergestellten Teststrukturen liegt deutlich unter dem der elektrosponnenen Teststrukturen. Vergleicht man sowohl die gemessenen mechanischen Eigenschaften als auch

die Literaturwerte von PDO als Nahtmaterial mit denen von Kollagen und Elastin, welche die Bestandteile von Weichgewebe sind, die hauptsächlich für die Struktur verantwortlich sind, liegen diese ebenfalls im gleichen Größenordnungsbereich. Bei Kollagen können Werte für die maximale Zugfestigkeit von 5-500 MPa und für den Young's Modulus von 100-2900 MPa gemessen werden, für Elastin Werte für die maximale Zugfestigkeit von 0,36-4,4 MPa und für den Young's Modulus von 0,1-1 MPa. Elastin weist mit 100-200% eine deutlich höhere Bruchdehnung als Kollagen mit 5-50% auf (Boland et al. 2005; Bank und Kaiser 2002). Beide Materialien sind auch verantwortlich für die mechanischen Eigenschaften von Blutgefäßen. In Blutgefäßen wirken diese mechanischen Eigenschaften der durch eine Pulswelle des Blutes ausgelösten Wandspannung entgegen. Bei niedrigem, ansteigendem Druck und demzufolge der Erfordernis einer noch relativ niedrigen arteriellen Dehnung (=Quotient aus der Veränderung der Dehnung und der Druckdifferenz) trägt vor allem das elastischere Elastin zum Gefäßwiderstand bei, bei höherem Druck das steifere Kollagen (Bank und Kaiser 2002). Je nach Verarbeitungsmethode und Struktur eines PDO-*Scaffolds* könnte basierend auf diesen Ergebnissen ein weiter Bereich an unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften für eine bestimmte Zielstruktur, z.B. für die angestrebte bioartifizielle Gefäßprothese, abgedeckt werden.

5.1.5 Überprüfung der Eignung von PDO als *Scaffold*-Material durch Test-Besiedelungen

Die Eignung der hergestellten *Scaffolds* für die weitere Verwendung wurde durch erste Besiedelungsversuche nach Auftragen von Fibrin mit einer Mischung aus HUVECs und MSCs getestet. Das Ziel war einerseits eine Überprüfung, ob die Zellen grundsätzlich auf den *Scaffolds* anwachsen und andererseits eine Überprüfung des Bewuchses mit Zellen hinsichtlich der späteren Funktion der *Scaffolds*. Für die 3D-gedruckten *Scaffolds* wäre somit eine durchgängige Besiedelung des *Scaffolds* für eine lückenlose Zellschicht (die Bildung einer Einzelzellschicht aus Endothelzellen) das Ziel, für die durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* ein guter Einwuchs der Zellen in die Poren, zur Bildung eines Gewebestückes. Hierbei konnte eine dichte Besiedelung der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* mit Zellen nach 14 Tagen in Kultur beobachtet werden. Die Poren der *Scaffolds* waren vollständig mit Zellen ausgefüllt (Abbildung 9, Abbildung 20). Dies entspricht den Erwartungen, die aufgrund der theoretischen Überlegungen in Abschnitt 5.1.2 skizziert wurden. Die 3D-gedruckten *Scaffolds* mit einem Strangabstand von $\sim 334,29 \mu\text{m}$ und damit einer ähnlichen Porengröße wie die der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* ($326,33 \mu\text{m} \pm 149,67 \mu\text{m}$) zeigten, dass die Poren nicht vollständig mit Zellen gefüllt waren und somit deutliche Lücken in der Besiedelung

vorhanden waren (Abbildung 9). Dies ist vermutlich auf das Oberflächen/Volumen-Verhältnis der 3D-gedruckten *Scaffolds* zurückzuführen, welche über eine geringere Oberfläche bei identischem Volumen im Vergleich zu den durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* verfügen. Für eine erfolgreiche Verwendung als bioartifizielle Gefäßprothese wird allerdings eine durchgehende Endothelzellschicht auf der *Scaffold*-Oberfläche aufgrund der anti-thrombogenen Wirkung von dieser benötigt (Inoguchi et al. 2007; Deanfield et al. 2007). Eine hohe Porosität mit einem möglichst großen Oberflächen/Volumen-Verhältnis ist ideal für das Zellwachstum. Am besten wäre laut Zeltinger *et al.* eine Porosität >75% (Zeltinger et al. 2001). Die Porosität der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* wurde mittels μ CT auf 73,38% bestimmt und liegt somit nahe bei dem von Zeltinger *et al.* genannten Wert.

5.1.6 Degradation der makroporösen PDO-*Scaffolds* mit und ohne Besiedelung

Die Degradation und die mikromechanischen Eigenschaften der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* wurden zusätzlich charakterisiert. Die porösen PDO-*Scaffolds* zeigten nach 28 Tagen in PBS einen Gewichtsverlust von $4,6\% \pm 0,5\%$ (Abbildung 12), ein ähnlicher Gewichtsverlust von 6% nach dem gleichen Zeitraum konnte auch von Adolfsson *et al.* für ein 3D-gedrucktes PDO-Objekt nach Inkubation in PBS beobachtet werden (Adolfsson et al. 2021). Eine morphologische Veränderung der Porenstruktur an der Oberfläche sowie im Inneren der *Scaffolds* konnte im Verlauf von 28 Tagen nicht beobachtet werden (Abbildung 10 und Abbildung 11). Die hohe Sprödigkeit der porösen *Scaffolds*, welche nach 28 Tagen in PBS zu beobachten war, ist höchstwahrscheinlich auf die schnellere Degradation der amorphen Bereiche des Polymers zurückzuführen (Adolfsson et al. 2021; Goonoo et al. 2015), die zu einem Verlust der Flexibilität führt (Abbildung 13). Eine Abnahme der mechanischen Belastbarkeit von PDX (Kruise, Dänemark) von 39,03% nach 10 Tagen Inkubation in der Submukosa eines explantierten Magens konnte auch von Kreszinger *et al.* beobachtet werden und ebenso für elektrogesponnene *Scaffolds* von Hakimi *et al.*, wobei hier die *Scaffolds* aufgrund der Sprödigkeit nach 50 Tagen in PBS nicht weiter analysiert werden konnten (Kreszinger et al. 2018; Hakimi et al. 2012). Bei mit Zellen besiedelten *Scaffolds* konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die besiedelten Strukturen intakt blieben und die *Scaffolds* nicht zerfielen (Abbildung 15). Dies ist ein entscheidender Faktor für die *Scaffold*-Entwicklung, da durch die Reifung des Gewebes die mechanischen Eigenschaften des *Scaffolds* durch die Zellen und deren extrazelluläre Matrix übernommen werden müssen (van Lith und Ameer 2011; Weinberg und Bell 1986). Dieser Effekt konnte auch durch die Analyse der mikromechanischen Eigenschaften an der *Scaffold*-Oberfläche durch Nanoindentation gezeigt werden. Hier wurde beobachtet, dass der Young's Modulus der besiedelten *Scaffolds* nach

kurzer Zeit in Kultur im Vergleich zum Ausgangswert von unbesiedelten *Scaffolds* deutlich reduziert war, nach 28 Tagen in Zellkultur stieg der Young's Modulus wieder auf die Höhe des Ausgangswertes an (Abbildung 14).

Ein anderer Aspekt der Degradation sind die Auswirkungen der Abbauprodukte auf die lokale Umgebung. Hier konnte von Hakimi *et al.* gezeigt werden, dass Abbauprodukte, wie Glyoxylsäure in hohen Konzentrationen (0,1-1 M) eine inhibierende Auswirkung auf die Zellproliferation haben können (Hakimi et al. 2012). Ebenso könnte eine Absenkung des pH-Wertes auftreten, diese wurde *in vitro* nach Inkubation eines PDO-Konstruktes in PBS für 28 Tage auf pH 3,3 von Adolfsson *et al.* gezeigt und auch unter anderen Bedingungen von Sabino *et al.* (Sabino et al. 2004; Adolfsson et al. 2021). In den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen konnte aufgrund des regelmäßigen Austausches des Zellkulturmediums keine Auswirkung der Degradation auf das Zellwachstum festgestellt werden. Im Vergleich zu anderen Materialien, wie z.B. PLLA/PLGA, die in ähnlichen Ansätzen zur Gewebeerstellung verwendet wurden (Levenberg et al. 2005; Freiman et al. 2018) und durch Freisetzung der Abbauprodukte Milchsäure und Glyoxylsäure, den pH stark absenken (Liu et al. 2006) sollte PDO deutlich bessere Ergebnisse liefert (Goonoo et al. 2015). Dies stellt einen weiteren Faktor für die Eignung von PDO für die *Scaffold*-Herstellung dar.

Analysen zur Degradation und den mikromechanischen Eigenschaften der 3D-gedruckten *Scaffolds* sind im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich gewesen und müssen zukünftig systematisch nachgeholt werden.

5.1.7 Geeignete Quellen für Fibrin als natürliche Komponente des biohybriden *Scaffolds*

Aufgrund der Vorteile eines biohybriden *Scaffolds* (siehe Abschnitt 3.7.2.3) wurde in dieser Arbeit Fibrin als zweite Komponente zur *Scaffold*-Herstellung untersucht. Fibrin wurde bereits in vielen Ansätzen im *Tissue Engineering* verwendet (Ahmed et al. 2008). Levenberg *et al.* haben Fibrin z.B. zur Beschichtung von porösen PLLA/PLGA-*Scaffolds* mit guten Ergebnissen hinsichtlich des Zellwachstums und der Vaskularisierung eingesetzt, wenn diese mit Endothelzellen besiedelt waren (Freiman et al. 2018; Levenberg et al. 2005). Ebenfalls gute Ergebnisse bei der Vaskularisierung in einem Fibrin-Kollagen-Gel konnten von Rao *et al.* gezeigt werden. Ein zunehmender Fibrinanteil der Gele führte zu einer stärker ausgeprägten Vaskularisierung (Rao et al. 2012). Für eine optimale Kompatibilität des Gewebes nach Implantation aufgrund der großen interindividuellen Heterogenität von Fibrinogen durch Polymorphismen, unterschiedliches Speißen der mRNAs, posttranslationale Modifikationen

und proteolytische Degradation (Maat und Verschuur 2005; Dietrich et al. 2013; Terasawa et al. 2014) wurde in dieser Arbeit eine Methode zur Isolation von Fibrinogen aus Blutplasma etabliert. Zu diesem Zweck wurde die Methodik der Kryopräzipitation zur Isolation ausgewählt. Diese Methode bietet trotz vergleichsweise niedrigerer Ausbeute den Vorteil, dass keine Reagenzien, wie z.B. Ethanol, zur Fällung benötigt werden, welche in folgenden Prozessschritten wieder entfernt werden müssten (Dietrich et al. 2013). Durch Kryopräzipitation konnte erfolgreich ein Proteinpräzipitat mit einer Konzentration von $86,6 \text{ mg/mL} \pm 3,5 \text{ mg/mL}$ isoliert werden, der Fibrinogenanteil lag bei durchschnittlich $41\% \pm 29,9\%$. Die großen Schwankungen sind einerseits durch eine stark variierende Fibrinogenkonzentration von $1,5\text{-}4,5 \text{ mg/mL}$ im Blut zu erklären (Fries et al. 2016) und andererseits durch Schwankungen bei der Isolationseffizienz. Die Zusammensetzung des Kryopräzipitats wurde durch eine reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE genauer untersucht und das Vorhandensein von Fibrinogen durch die Identifizierung der Fibrinogen-alpha-Kette mittels Western Blot verifiziert (Abbildung 16). Neben der bzw. den Banden von Fibrinogen konnte insbesondere eine Bande mit einer Größe von 66 kDa als Albumin identifiziert werden (Belinskaia et al. 2021). Eine Dialyse unter Verwendung einer Membran mit einem Molekulargewichtsgrenzwert von 100 kDa führte nur zu einer geringen Reduktion der Proteine unter 100 kDa , ist aber dennoch sinnvoll, damit fibrinolytische Komponenten, wie das Plasminogen als Vorläufer des fibrinolytisch aktiven Plasmins, mit einer Größe von 92 kDa möglichst reduziert werden (Heit 2013), da reine Fibrin-*Scaffolds* ohnehin nur für ein bis zwei Wochen stabil sind (Robinson et al. 2017).

5.1.8 Fazit: PDO und Fibrin als Materialien für ein biohybrides Scaffold

Sowohl durch 3D-Druck, als auch durch Salzlaugung konnten mögliche Test-*Scaffolds* aus PDO für die Erstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese hergestellt werden. Die durch 3D-Druck hergestellten *Scaffolds* verfügen über eine geordnete, reproduzierbar herstellbare innere Struktur im Vergleich zu den durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds*. Ebenfalls von Vorteil ist, dass anstatt einer Gussform für die Herstellung nur ein am Computer erstelltes 3D-Modell benötigt wird. Für die PDO-*Scaffolds* konnte eine optimale Biokompatibilität festgestellt werden und die mechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen *Scaffold*-Typen liegen in einem Bereich, welcher gut für die Herstellung von Weichgewebe geeignet ist. Zusätzlich könnte das Formgedächtnis, d.h. die Fähigkeit eines Materials nach Verformung in seine ursprüngliche Form zurückzukehren, welches PDO besitzt, positiv für die Erstellung vaskulärer Prothesen sein (Goonoo et al. 2015). Die Kombination des synthetischen Polymers PDO und des natürlichen Polymers Fibrin, welches erfolgreich aus Blutplasma isoliert werden konnte, zu

einem biohybriden *Scaffold* verspricht eine vielversprechende Kombination für die Herstellung von *Scaffolds* im *Tissue Engineering* zu sein. In ersten Zellkulturexperimenten wurde für dieses biohybride *Scaffold* gezeigt, dass MSCs und HUVECs dicht anwachsen. Für die Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese ist eine solche zusammenhängende Zellschicht als endothelialer Monolayer erforderlich. Sie ist auch aufgrund der anti-thrombogenen Wirkung entscheidend für die Funktionalität der Gefäßprothese (Pashneh-Tala et al. 2016). In den ersten Test-Besiedelungen zeigte sich jedoch, dass es aufgrund der mangelnden Filigranität der 3D-gedruckten Test-*Scaffolds* noch nicht möglich war, eine durchgängige Zellschicht auf dem *Scaffold* zu erreichen, welche auch die Poren auffüllt. Dies ist wahrscheinlich auf das niedrige Oberflächen/Volumen-Verhältnis der 3D-gedruckten *Scaffolds* zurückzuführen (Zeltinger et al. 2001). Weitere Arbeiten zur Herstellung von PDO-*Scaffolds* mittels 3D-Druck wurden an dieser Stelle aufgrund des Umfangs aus dieser Arbeit ausgegliedert.

Die Arbeit fokussiert stattdessen auf die durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds*. Diese bieten eine ideale Struktur für das Einwachsen von Zellen und es wurde eine Strategie zur Vaskularisierung, d.h. Kapillarbildung auf diesen *Scaffolds* im Folgenden etabliert (Abschnitt 5.2).

5.2 Entwicklung einer Strategie zur Integration und Quantifizierung eines Kapillarnetzwerks in die biohybriden PDO-*Scaffolds*

Es wurde versucht, ein Kapillargefäßnetzwerk in den porösen, durch Salzlaugung hergestellten und mit Fibrin beschichteten biohybriden *Scaffolds* zu erzeugen. Der in dieser Arbeit präsentierte Ansatz zur Herstellung eines Kapillarnetzes auf den besiedelten *Scaffolds* beruht auf dem Mechanismus der spontanen Selbstorganisation (vgl. Abschnitt 3.6.1).

Hierfür wurden in dem hier untersuchten Ansatz aus Fettgewebe isolierte adulte MSCs (sog. AD-hMSCs; Spenderkodierung: AD47N) in Kombination mit kommerziell erhältlichen HUVECs verwendet. Die Kombination aus mesenchymalen Stammzellen mit Endothelzellen zur Erzeugung eines vaskulären Netzwerks ist in der Literatur etabliert: So konnte die Netzwerkbildung ab Tag zwei bis drei nach Besiedelung in einem Hydrogel von Andrée *et al.* gezeigt werden (Andrée et al. 2019). In einem Ansatz zur Besiedelung poröser PLLA/PLGA-*Scaffolds* von Freiman *et al.* konnte dies ebenfalls nachgewiesen werden (Freiman et al. 2018).

Basierend auf dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Ansatz zur Erzeugung von Zellkulturmedium, welches mit angiogenen Wachstumsfaktoren angereichert ist (siehe Dissertation von Stefanie Thoms; Thoms 2019) wurden die HUVECs und MSCs auf den

porösen PDO-*Scaffolds* in den ersten in dieser Arbeit dargestellten Versuchen zur Vaskularisierung mit einer Mischung aus diesem Medium und frischem basalem α MEM in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert (Abschnitt 8.3.2.2).

5.2.1 Erzeugung eines Kapillarnetzwerks auf biohybriden PDO-*Scaffolds*

In einem ersten Schritt der Besiedelung der biohybriden PDO-*Scaffolds* wurde das Verhältnis zwischen MSCs und HUVECs variiert für eine erfolgreiche Netzwerkbildung optimiert. Mischungs-Verhältnisse von 5:1, 2:3 und 1:5 von HUVECs und MSCs wurden getestet (Abbildung 17) und die Ratio von 2:3 als optimal beschrieben. In der Literatur werden verschiedene Zellzahlkombinationen zur Erzeugung vaskulärer Netzwerke dargestellt. In einer Untersuchung zur Auswirkung des Verhältnisses von HUVECs und MSCs auf die Netzwerkbildung wurden von Rao *et al.* die Kombinationen 5:1, 3:2, 1:1, 2:3 und 1:5 analysiert. In dieser Studie konnten signifikant bessere Ergebnisse bei einem Verhältnis von 3:2 von HUVECs zu MSCs festgestellt werden. Im Gegensatz dazu verwendeten Lesman *et al.* HUVECs und Fibroblasten in einem Verhältnis von 5:1 (Lesman *et al.* 2011) mit guten Ergebnissen und Andrée *et al.* HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 1:1 (Andrée *et al.* 2019). Aufgrund der heterogenen Ansätze mit jeweils positiven Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das ideale Mischverhältnis der Zellen wahrscheinlich von variierenden Einflussfaktoren abhängig ist und im Einzelfall stark variieren kann und jeweils angepasst werden muss. Im zweiten Schritt zur Erzeugung eines Gefäßnetzwerks wurde die Gesamtzellzahl zur Besiedelung der *Scaffolds* variiert, um Auswirkungen auf die Netzwerkbildung festzustellen. Die Gesamtzellzahl pro *Scaffold* sollte so gewählt sein, dass das gesamte *Scaffold* gleichmäßig mit Zellen besiedelt werden kann. Hierbei zeigte sich, dass eine Besiedelung mit Zellen bereits ab 250.000 Zellen pro *Scaffold* gewährleistet ist und eine höhere Zellzahl keine positiven Auswirkungen hat.

Als weitere Optimierung wurde das Zellkulturmedium verändert. Um den HUVECS bessere Bedingungen für die Netzwerkbildung zu bieten, wurde das Medium so angepasst, dass der Anteil an basalem α MEM durch basales EGM-2 ersetzt wurde. EGM-2 ist für die Versorgung von Endothelzellen optimiert und wird oft in Studien zur Vaskularisierung eingesetzt (Lesman *et al.* 2011; Levenberg *et al.* 2005; Andrée *et al.* 2019). Um die Zellen zusätzlich zu stimulieren, wurde dem Medium ergänzend HS zugesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von HS zum konditionierten Zellkulturmedium in Kombination mit einem 50%-Anteil an basalem EGM-2 zu einer deutlich verstärkten Netzwerkbildung der HUVECs auf den PDO-*Scaffolds* führt (Abbildung 18). Die Zugabe eines Gesamtserumpräparats, z. B. aus humaner oder

tierischer Quelle, fördert grundsätzlich die Netzwerkbildung der HUVECs, da es wichtige Inhaltsstoffe wie bestimmte Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle enthält, die für das Zellwachstum und den Zellmetabolismus essentiell sind (Franke et al. 2014). Die Zugabe von Serum zum Zellkulturmedium während der Kultivierung wird in vielen Ansätzen zur Vaskularisierung durchgeführt, aber nicht in allen. Lesman *et al.* haben in einem zur Vaskularisierung von PLLA/PLGA-*Scaffolds* mit Fibroblasten und HUVECs Zellkulturmedium mit einem Anteil von 6% FKS verwendet (Lesman et al. 2011), Rao *et al.* haben in ihrem Ansatz zur Untersuchung der Vaskularisierung von Fibrinogen/Kollagen-Gelen Zellkulturmedium mit 10% FKS verwendet (Rao et al. 2012). Im Gegensatz dazu konnte von Andréé *et al.* eine Vaskularisierung sowohl mit einem Serum-freien Medium als auch bei der Verwendung von EGM-2 mit 2% FKS gezeigt werden, wobei bessere Ergebnisse unter Verwendung des Serum-freien Mediums erzielt werden konnten (Andrée et al. 2019). Aufgrund der unbekanntenen Zusammensetzung von Serum und einer möglichen Variabilität der Inhaltsstoffe abhängig von der Charge (van der Valk et al. 2018), wäre die Verwendung eines Serum-freien Zellkulturmediums zu bevorzugen. Ebenfalls könnte es wegen eventueller Rückstände im Implantat nach der Implantation zu immunologischen Problemen kommen. Eine mögliche Lösung der Problematik wäre die Etablierung eines Serum-freien Zellkulturmediums, wie von Andréé *et al.* verwendet, um einen standardisierten Prozess zu kreieren oder die Verwendung von autologem HS, welches als „Abfallprodukt“ aus der Fibrinogen-Isolation (Abschnitt 4.1.2.6) gewonnen werden könnte, wodurch die immunologischen Probleme gelöst werden könnten. In dieser Arbeit wurde aber auch gezeigt, dass die Verwendung von EGM-2-Zellkulturmedium, welches standardmäßig mit einer Vielzahl an Wachstumsfaktoren angereichert ist, nicht zu einer verstärkten Netzwerkbildung der HUVECs führt, sondern stattdessen das Wachstum der HUVECs zu stark induziert und diese somit eine konfluente Schicht auf dem *Scaffold* bilden (Abbildung 18). Dies steht im Gegensatz zu den eben dargestellten Ansätzen von Lesman, Levenberg und Andréé, welche mit der Verwendung von voll supplementiertem EGM-2 positive Ergebnisse hinsichtlich der Vaskularisierung erzielen konnten (Levenberg et al. 2005; Lesman et al. 2011; Andréé et al. 2019).

Die zuvor dargestellten Ergebnisse lassen hinsichtlich ihrer Tendenz zwar klare Aussagen bezüglich der Gesamtzellzahl und des Zellzahlverhältnisses treffen, jedoch war während aller Experimente eine hohe Varianz der Ergebnisse, genauer gesagt, der Intensität der Netzwerkbildung, zu beobachten. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine schwankende Konzentration der Wachstumsfaktoren im konditionierten Zellkulturmedium aufgrund einer variierenden Ausgangskonzentration oder einer unterschiedlich langen Lagerungsdauer,

welche zur Degradation der Wachstumsfaktoren führt (Shields et al. 2019; Ding und Peterson 2021), zurückzuführen. Somit könnten für die Erzeugung vaskulärer Netzwerke und für die Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese keine konstanten Bedingungen gewährleistet werden. Weitere relevante Faktoren, welche für die Entwicklung einer Gefäßprothese in Betracht gezogen werden müssen, sind, dass die Herstellung des konditionierten Zellkulturmediums den Herstellungsprozess der Gefäßprothese um ca. drei Wochen verlängern würde sowie die Spender-abhängige Intensität der Sekretion von Wachstumsfaktoren von MSCs (Thoms 2019; Yang et al. 2020; Sacchetti et al. 2016), welche ebenfalls problematisch für einen standardisierten Herstellungsprozess wäre. Unabhängig von der Intensität der Sekretion von Wachstumsfaktoren konnte von Sacchetti *et al.* gezeigt werden, dass alle MSCs trotz ihrer Heterogenität dazu geeignet sind, als perivaskuläre Zellen zu fungieren (Sacchetti et al. 2016). Aus diesen Gründen wurde in Folgeansätzen basales Zellkulturmedium mit 2% HS und verschiedenen Wachstumsfaktoren für die Kultivierung der HUVECs und MSCs auf den porösen PDO-*Scaffolds* verwendet, um so ein standardisiertes Verfahren zu etablieren.

Bei den Wachstumsfaktoren, die dem Zellkulturmedium zugesetzt wurden, wurden VEGF und bFGF in einer Konzentration von 10 ng/mL ausgewählt. VEGF ist der wichtigste Wachstumsfaktor in der Angiogenese (Carmeliet 2005; Shibuya 2011). bFGF spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese (Liu et al. 2013). Beide Wachstumsfaktoren wurden ebenfalls in einer Konzentration von 10 ng/mL von Andrée *et al.* in ihrem Serum-freien Zellkulturmedium zur Vaskularisierung eingesetzt und sind auch Bestandteile von kommerziell erhältlichem EGM-2. EGM-2 von Promocell enthält 0,5 ng/mL VEGF und 10 ng/mL bFGF (PromoCell GmbH). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren bessere Ergebnisse hinsichtlich der Netzwerkbildung liefert als nur die Verwendung von einem der beiden.

Nach der Etablierung eines standardisierten Zellkulturmediums wurde die initiale Netzwerkbildung auf den biohybriden *Scaffolds* bei der Kokultur aus HUVECs und MSCs untersucht. Diese erfolgte im Verlauf von sieben Tagen (Abbildung 22). Diese Beobachtung zur Organisation der Endothelzellen zu ausgeprägten Netzwerkstrukturen stimmt überein mit Beobachtungen von Andréé *et al.* und Blinder *et al.* sowie vielen weiteren (Blinder et al. 2015; Andréé et al. 2019). Die Bedeutung des Vorhandenseins der MSCs für die Netzwerkbildung auf den *Scaffolds* durch ihre Wirkung als perivaskuläre Zellen und durch ihre Sekretion pro-angiogener Faktoren (Au et al. 2008; McFadden et al. 2013) wurde durch Substitution verifiziert. In Monokultur bilden die HUVECs nur eine konfluente Schicht auf der *Scaffold-*

Oberfläche (Abbildung 19), diese Beobachtung konnte auch von Liu *et al.* bei der Besiedelung von Kalziumphosphat-*Scaffolds* gemacht werden (Liu et al. 2017).

Aufgrund der Erfahrungen hinsichtlich der Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen an Wachstumsfaktoren durch Verwendung des konditionierten Zellkulturmediums, wurde zusätzlich zu dem mit 10 ng/mL VEGF und bFGF angereicherten Zellkulturmedium, die Wirkung der Zugabe einer höheren Konzentration von 20 ng/mL VEGF und bFGF untersucht. Ebenfalls wurde aufgrund des permissiven Effekts von Hydrocortison (Goding 2009), dessen Effekt auf die Netzbildung in Kombination mit VEGF und bFGF analysiert. Hydrocortison wurde ebenfalls von Andrée *et al.* in ihrem Serum-freien Zellkulturmedium zur Vaskularisierung verwendet und ist in supplementiertem EGM-2 vorhanden. Die Verwendung des am höchsten supplementierten Zellkulturmediums mit 20 ng/mL VEGF, bFGF und Hydrocortison resultierte in signifikant ausgeprägteren Netzwerkstrukturen als die Verwendung der anderen getesteten Medien. Sowohl die Gesamtgefäßfläche, die Gesamtgefäßlänge und die Anzahl der Verzweigungen waren erhöht (Abbildung 25). Somit sollte für eine optimale Vaskularisierung der biohybriden *Scaffolds* das höher supplementierte Medium verwendet werden.

In Anbetracht des maximalen Abstandes von $\sim 200 \mu\text{m}$ den Zellen aufgrund des Diffusionslimits für Sauerstoff und Nährstoffe zu einem Blutgefäß haben sollten (Carmeliet und Jain 2000), ergibt sich für die mit je 20 ng/mL VEGF, bFGF und Hydrocortison inkubierten *Scaffolds* ein sehr guter Wert von einem maximal möglichen Abstand zweier Stränge untereinander von $218 \mu\text{m}$. Dieser Wert wurde anhand der 2D-Projektion der Netzwerkstrukturen in Abbildung 26 berechnet. Das bedeutet, dass die HUVECs ein Netzwerk bilden, welches für die Versorgung des Gewebes geeignet wäre. Die Bildung eines Lumens innerhalb der endothelialen Netzwerke konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 27). Das Vorhandensein des Lumens ist entscheidend für die Funktionalität des endothelialen Netzwerkes als Kapillargefäßsystem (Davis et al. 2011).

Die Verwendung von autologem Fibrinogen für die Herstellung eines biohybriden *Scaffolds* resultierte in einer verringerten, aber dennoch guten Netzbildung der HUVECs. Dies ist vermutlich auf den geringeren Fibrinogen-Anteil im isolierten Präzipitat von ca. 41% im Vergleich zu ca. 50% bei dem kommerziell erhältlichen Fibrinogen zurückzuführen. In weiteren Versuchen sollte evaluiert werden, ob eine Erhöhung der Menge des verwendeten Proteinpräzipitats zu einer Verbesserung der Netzbildung führt. Aufgrund der interindividuell abweichenden Zusammensetzung von Fibrinogen aufgrund von

Polymorphismen (Maat und Verschuur 2005; Terasawa et al. 2014) wäre allerdings trotz einer etwas schlechteren Netzwerkbildung die Verwendung des autologen Fibrinogens vorzuziehen, um ein personalisiertes *Scaffold* herzustellen.

5.2.2 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der gebildeten Netzwerkstrukturen

Für die Analyse der dreidimensionalen Netzwerkstrukturen wurde eine systematische Methode etabliert. Diese beruht auf der Vereinfachung der aufgenommenen Z-Stapel zu einer Überlagerung in einem Bild (Abbildung 24). Zu diesem Zweck wurden je 100 konfokale Fluoreszenzbilder übereinander projiziert und zu einem Einzelbild vereint. Die sichtbaren Netzwerkstrukturen wurden in einem Graustufenbild mit einem Algorithmus auf Basis der Grauwerte aufgrund einer hohen Hintergrundfluoreszenz durch das *Scaffold* selbst herausgefiltert. Das resultierende Bild wurde mit dem Original verglichen und anschließend mit AngioTool (Zudaire et al. 2011) analysiert. Obwohl die analysierten Netzwerkstrukturen durch die Projektion somit nicht vollständig der Realität entsprechen, hat sich gezeigt, dass diese Methode gut dazu geeignet ist, Unterschiede in der Ausprägung der Netzwerkstrukturen zu quantifizieren. Insbesondere muss beachtet werden, dass die bestimmte Gesamtanzahl an Verzweigungen aufgrund der Projektion von Netzwerkstrukturen aus mehreren Ebenen nicht der Realität entspricht.

5.2.3 Fazit: Vaskularisierung eines biohybriden *Scaffolds*

Die Integration eines Gefäßnetzwerks in ein biohybrides *Scaffold* aus PDO und Fibrin konnte durch Besiedelung mit HUVECs und MSCs erfolgreich umgesetzt werden. Die MSCs wirken in diesem Kontext als perivaskuläre Zellen und unterstützen die vaskuläre Netzwerkbildung. Als ideal für die Vaskularisierung hat sich in dem hier präsentierten Ansatz die Verwendung einer Gesamtzellzahl von 250.000 mit einem Verhältnis von 2:3 von HUVECs zu MSCs herausgestellt. Als Zellkulturmedium wurde ein künstlich supplementiertes Medium mit VEGF, bFGF und Hydrocortison in einer Konzentration von 20 ng/mL und 2% HS im Vergleich zu schwächer supplementiertem Medium oder dem konditioniertem Medium als überlegen identifiziert. Innerhalb der gebildeten endothelialen Netzwerkstrukturen konnte ein Lumen nachgewiesen werden und die Netzwerkstrukturen liegen für eine optimale Versorgung der Zellen nahe genug beieinander. Zur Analyse der Netzwerkstrukturen konnte ein Prozess zur Quantifizierung der Netzwerkstrukturen auf den *Scaffolds* mit Hilfe der Software AngioTool etabliert werden. Der hier etablierte Ansatz ist entscheidend hinsichtlich der notwendigen

Vaskularisierung der Gefäßwand einer bioartifiziellen Gefäßprothese, könnte aber auch allgemein zur Vaskularisierung eines *Scaffolds* im *Tissue Engineering* angewendet werden.

5.3 Charakterisierung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktorsystem mit anschließender Test-Besiedelung

Für die *in vitro* Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese mittels *Tissue Engineering* wird zur Reifung des Gewebes ein spezielles Bioreaktorsystem benötigt (Abschnitt 3.9.4). Das hier präsentierte Bioreaktorsystem wurde mit Rücksicht auf die notwendigen Anforderungen zur Herstellung eines ATMP in Kooperation mit dem Institut für Mikroelektronische Systeme der Leibniz Universität Hannover entwickelt. Alle in Kontakt mit dem Zellkulturmedium stehenden Materialien erfüllen die Anforderungen der ISO10993 und die Anforderungen der Klasse 4 des US-amerikanischen Arzneibuchs. Eine detaillierte Beschreibung der technischen Informationen kann der Veröffentlichung von Stanislawski *et al.* entnommen werden (Stanislawski *et al.* 2020).

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Charakterisierung des Bioreaktorsystems und der Optimierung der Kultivierungsbedingungen hinsichtlich der Eignung zur Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese sowie das Resultat einer Besiedelung eines dezellularisierten Gefäßes mit HUVECs als Testkultivierung diskutiert.

5.3.1 Eignung des Bioreaktorsystems für die Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese

Für die Kultivierung der bioartifiziellen Gefäßprothese muss das entwickelte Bioreaktorsystem in der Lage sein, ideale Bedingungen zu erzeugen. Neben den Parametern Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt, welche durch den Inkubator bereitgestellt und geregelt werden, muss das System einen physiologischen Volumenstrom durch die Gefäßprothese und einen Druck, welcher sowohl konstant, als auch pulsatil sein kann, erzeugen können (Vergleich Abschnitt 3.9.4). Der Volumenstrom dient einerseits zum Austausch des Zellkulturmediums und andererseits kann durch die Regelung der Flussrate ein definierter Scherstress auf der inneren Seite der tubulären Gefäßprothese erzeugt werden, welcher für die Reifung der auf der Innenseite angesiedelten Endothelzellen zu einem dichten Endothelium benötigt wird. Neben der Fließgeschwindigkeit des Fluids ist der Scherstress auch abhängig von dessen Viskosität. Daher wurde im ersten Schritt zur Erzeugung physiologischer Bedingungen die Viskosität des Zellkulturmediums durch Zugabe von MC angepasst. Die Viskosität des EGM-2-Zellkulturmediums konnte auf diese Weise erfolgreich über einen weiten Bereich angepasst werden, jedoch war ein stark scherverdünnendes Verhalten zu beobachten

(Abbildung 30). Dieses Verhalten ist für MC-Lösungen typisch (Micklavzina et al. 2020; Morozova et al. 2018). MC eignet sich im Vergleich zu anderen Additiven zur Erhöhung der Viskosität, wie Xanthan oder Pektin, besonders gut, da durch Hitzesterilisation die chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht beeinflusst werden (Hodder et al. 2019; Munarin et al. 2013; Bindal et al. 2007). Durch die Erhöhung der Viskosität musste für eine identische Flussrate ein erhöhter Druck aufgewendet werden (Abbildung 32). Ebenso konnte der Gesamtdruck im System durch das Anlegen eines Gegendrucks im Mediumreservoir unabhängig vom Volumenstrom geregelt werden. Dies war nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille zu erwarten. Auf Basis der Viskositätswerte konnte mit Hilfe der Software Comsol Multiphysics der für verschiedene Flussraten resultierende Scherstress erfolgreich berechnet werden. Der Einsatz der Software war aufgrund des scherverdünnenden Verhaltens der MC-Lösungen notwendig. Die nötigen Flussraten, um physiologische Scherraten bis zu 20 dyn/cm^2 zu erzeugen, können bei Verwendung einer 2,5%igen MC-Lösung erreicht werden (Abbildung 35). In Arterien wirkt unter physiologischen Bedingungen ein Scherstress von $10\text{-}70 \text{ dyn/cm}^2$ mit mittleren Werten von $10\text{-}15 \text{ dyn/cm}^2$, wohingegen in Venen ein deutlich niedrigerer Scherstress von $1\text{-}6 \text{ dyn/cm}^2$ herrscht (Papaioannou und Stefanadis 2005; Lehoux et al. 2006). Der auf die Endothelzellen wirkende Scherstress beeinflusst verschiedenste zelluläre Funktionen. Er führt zur Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung, zu einer niedrigeren Proliferationsrate und unterdrückt die Expression inflammatorischer Botenstoffe, ebenso erhöht er die Proliferation von SMCs in der Gefäßwand und führt somit zu einem erhöhten Gefäßdurchmesser (Papaioannou und Stefanadis 2005; Hahn und Schwartz 2009; Li et al. 2005). Die Bildung des dichten Endotheliums aufgrund des angelegten Scherstress ist entscheidend für die Funktionalität der Gefäßprothese aufgrund der anti-thrombogenen Wirkung (Inoguchi et al. 2007). Mit dem im Bioreaktor integrierten Drucksystem können bis zu 500 mbar Druck erzeugt und somit sowohl hypotonische (unter $120/80 \text{ mbar}$, bzw. $90/60 \text{ mmHg}$) als auch schwer hypertensive (bis zu $240/160 \text{ mbar}$, bzw. $180/120 \text{ mmHg}$) physiologische Druckverhältnisse im Bioreaktorsystem angelegt werden (Shahoud et al. 2021). Die Verwendung eines Druckes über 240 mbar könnte zum Austreten des Berstdruckes des Gefäßes verwendet werden. Ebenso konnten verschiedene exemplarische Druckpulse (Abbildung 33) erzeugt werden. Die Pulsation ist entscheidend für die Reifung der Zellen in der Gefäßwand (Hahn et al. 2007; Diamantouros et al. 2013; Hahn und Schwartz 2009). Es konnten im inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems keine erhöhten Verweilzeiten durch eventuelle Toträume anhand eines *Tracers* identifiziert werden. Wie zu erwarten führte eine Verringerung der Flussraten zu einer Verschiebung der mittleren Verweilzeit im Vergleich zum

Maximum der Verweilzeitverteilung nach rechts (Abbildung 31). Die Veränderung der Viskosität des Fluids hatte keine Auswirkungen auf den Zeitpunkt des gemessenen Maximums, jedoch führte eine höhere Viskosität zu einer Verschiebung der mittleren Verweilzeit. Ein gestörter Volumenstrom, d.h. eine zu langsame Fließgeschwindigkeit, eine Umkehrung der Flussrichtung oder eine Grenzschichtablösung, führt *in vivo* zu einer hohen Proliferations- und Apotoserate der Zellen sowie dazu, dass sich die Zellen nicht in Flussrichtung ausrichten und eine hohe Permeabilität aufweisen. In Folge dessen kommt es zur Bildung von Artherosklerose (Hahn und Schwartz 2009). Aus diesem Grund dürfen die eben genannten Phänomene nicht innerhalb der Gefäßprothese auftreten. Bei den in der zentralen Bioreaktorkammer eingesetzten Teststrukturen konnte hinsichtlich der Auswirkungen auf einen exemplarischen Druckpuls keine relevante Auswirkung festgestellt werden (Abbildung 34). Eine Abweichung wäre allerdings aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturen unerwartet gewesen.

Für eine vollständige Prozesskontrolle sollen neben der Überwachung von Druck, Flussrate, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pO_2 und pCO_2 auch metabolische Parameter überwacht werden. Zu diesem Zweck wurde für die Probenentnahme und Probenanalyse ein FIA-System etabliert. Während einer Kultivierung konnten mit dem FIA-System steril Proben entnommen werden. Mit dem integrierten Glukosesensor konnten Konzentrationen zwischen 2,5-25 mM hinreichend genau gemessen werden (Abbildung 37). Dies ist ein wichtiger Faktor, da die Zellen während der gesamten Kultivierung im Bioreaktorsystem mit Nährstoffen versorgt werden müssen. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Testkultivierung im Bioreaktorsystem konnte zwar kein signifikanter Verbrauch an Glukose der HUVECs gemessen werden (Abbildung 42), zukünftig ist jedoch mit einem deutlich stärkeren Glukoseverbrauch zu rechnen, da zusätzliche Zelltypen, wie MSCs, Fibroblasten oder SMCs, in die bioartifizielle Gefäßprothese integriert werden sollen. Ebenfalls sollen die HUVECs durch autolog extrahierbare endotheliale, Kolonie-bildende Zellen (ECFCs, engl.: *endothelial colony forming cells*) substituiert werden, welche unter Scherstress einen deutlich höheren Glukoseverbrauch aufzeigen (Kraus et al. 2021).

Auf Basis der gemessenen Viskositätswerte der unterschiedlichen MC-Konzentrationen und dem daraus berechneten Scherstress bei unterschiedlichen Flussraten wurden zwei Kultivierungsprotokolle entwickelt, eines davon mit quasi-statischen Flussbedingungen und einem Scherstress unter $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ (Abschnitt 4.4.2) und eines mit einem erhöhten Scherstress von 5 dyn/cm^2 (Abschnitt 4.4.5).

Im Vergleich mit anderen entwickelten Bioreaktorsystemen zur Kultivierung bioartifizieller Gefäßprothesen verschiedener Arbeitsgruppen (Wolf et al. 2018; Schulte et al. 2014; Diamantouros et al. 2013; Prim et al. 2018; Melchiorri et al. 2016; Huang et al. 2015; Hahn et al. 2007) ist das hier charakterisierte Bioreaktorsystem unter Verwendung von mit MC angedicktem Zellkulturmedium in der Lage, nahezu alle Funktionen zu erfüllen, welche von den anderen entwickelten Systemen bereitgestellt werden. Die umfangreichsten Funktionen bietet das System „Vascutrainer“ von Wolf *et al.* Dieses ist in der Lage, sowohl eine Flussrate von 200 mL/min bei einem Druck von 120/80 mmHg mit einer Frequenz von 0,5-1 Hz zu erzeugen. Währenddessen können erzeugter Druck und Volumenstrom gemessen und geregelt werden. Mit dem System können Gefäßprothesen mit einem Durchmesser von 3 mm kultiviert werden. Das System bietet ein sehr geringes Packmaß und ist dadurch transportabel (Wolf et al. 2018). Die anderen genannten Systeme bieten diese Funktionen, Variationen oder auch nur Auszüge davon. Das System von Huang *et al.* bildet dazu eine Ausnahme, es kann neben umlaufendem Stress durch Pulsation auch zyklischen Stress durch axiale Dehnung ausüben, dieser führte zur einer erhöhten Elastin-Bildung in der Gefäßwand (Huang et al. 2015). Eine Integration axialer Dehnung in das in dieser Arbeit charakterisierte System wäre jedoch aktuell nicht möglich. Hierzu müssten grundlegende Designänderung vorgenommen werden. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das hier präsentierte System aufgrund des verwendeten Drucksystems mit einem maximalen Druck bis zu 500 mbar und der freiprogrammierbaren Pulsation sowie der Peristaltikpumpen in der Lage ist, einen größeren Bereich an potentiellen Kultivierungsbedingungen bereitzustellen als vergleichbare Systeme, dass es jedoch auch deutlich größer ist. Durch eine einfache Variation der Tüllen der zentralen Bioreaktorkammer könnten Gefäße mit unterschiedlichen Durchmessern kultiviert werden. Das System bietet ebenso mehr Möglichkeiten der Überwachung des Kultivierungsprozesses. Hierbei können neben Druck und Volumenstrom auch metabolische Parameter durch die angeschlossene FIA untersucht werden sowie das Wachstum der Struktur durch Ultraschall überwacht werden. Die vollständige Überwachung und Kontrolle des Prozesses ist aufgrund der Einstufung einer bioartifiziellen Gefäßprothese als ATMP sinnvoll.

5.3.2 Überprüfung der Funktionalität des Bioreaktorsystems durch eine Testkultivierung

Für die Überprüfung der Funktionalität des Bioreaktorsystems wurde eine Testkultivierung durchgeführt. Hierfür sollte ein dezellularisiertes Gefäß eines Schweines mit HUVECs neu besiedelt werden, damit eine konfluente Zellschicht auf der inneren Gefäßseite gebildet wird. Zu diesem Zweck wurde ein Besiedlungsprotokoll basierend auf Erfahrungen zur Bildung

einer konfluenten Endothelzellschicht in IbiDi-Flusskammern (IbiDi GmbH, Gräfelfing) innerhalb der Arbeitsgruppe angefertigt (Thoms 2019; Kraus et al. 2021). Die Zellen wurden unter konstanter Rotation der zentralen Bioreaktorkammer von fünf RPM für sechs Stunden in der Kammer im Gefäß inkubiert, um eine Adhäsion zu ermöglichen, danach wurde das Medium in der Kammer getauscht und die Zellen für weitere 18 Stunden ohne einen angelegten Volumenstrom kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Gefäß für weitere sechs Tage im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen ($<0,5 \text{ dyn/cm}^2$) kultiviert. Die Auswertung offenbarte eine konfluente Zellschicht auf der Gefäßinnenseite (Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41). Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Endothelialisierung im Bioreaktorsystem möglich ist und das Besiedlungsprotokoll dazu geeignet ist, eine endotheliale Einzelzellschicht auf der inneren Gefäßoberfläche eines dezellularisierten Schweinegefäßes zu erzeugen, welche aufgrund der Funktionalität der Gefäßprothese notwendig ist (Pashneh-Tala et al. 2016; Deanfield et al. 2007). Eine konfluente Besiedelung konnte von Eyre *et al.* in einem ähnlichen Protokoll zur Besiedelung eines dezellularisierten Schweinegefäßes in einem rotierenden Bioreaktor gezeigt werden (vier Stunden Anwachszeit, Rotation mit vier RPM) (Eyre et al. 2021). Die verwendete Zellzahl von $1 \cdot 10^5 \text{ Zellen/cm}^2$ hat sich als ausreichend herausgestellt, im Vergleich dazu wurden von Thoms $0,6 \cdot 10^5 \text{ Zellen/cm}^2$ und von Kraus *et al.* $1,4 \cdot 10^5 \text{ Zellen/cm}^2$ in IbiDi-Flusskammern ausgesiedelt (Kraus et al. 2021; Thoms 2019) sowie von Eyre *et al.* $0,25 \cdot 10^5 \text{ Zellen/cm}^2$ bei der Besiedelung des Schweinegefäßes (Eyre et al. 2021). Das etablierte Protokoll kann zukünftig für die Besiedelung einer bioartifiziellen Gefäßprothese mit Endothelzellen im Bioreaktorsystem übertragen werden.

Da eine Gefäßprothese nach Reifung im Bioreaktorsystem nicht sterilisiert werden kann, ist es entscheidend, dass dieser Prozess unter aseptischen Bedingungen stattfindet. Zu diesem Zweck wurden fast alle Teile des Bioreaktorsystems vor der Kultivierung bei 121°C für min 15 min dampfsterilisiert. Dies ist für medizinische Produkte als Standard etabliert (RKI 2011). Alle anderen Teile, die in Kontakt mit dem Zellkulturmedium kommen, wurden bereits sterilisiert erworben, beispielsweise Sterilfilter. Die Keimfreiheit des Zellkulturmediums wurde nach der Kultivierung mit dem Microsart RESEARCH Bacteria Kit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin) überprüft. Hierbei konnte keine Kontamination festgestellt werden (Abschnitt 4.4.4). Zukünftig sollte die Verwendung des Microsart ATMP Sterile Release Kits (Minerva Biolabs GmbH, Berlin) angestrebt werden, da dieses speziell für die Herstellung von ATMPs entwickelt ist und die Anforderungen des europäischen Arzneibuches Kapitel 5.1.6 (*Alternative methods for*

control of microbiological quality) und 2.6.27 (*Microbiological Examination of cell-based Preparations*) erfüllt.

5.3.3 Fazit: Analyse des Bioreaktorsystems

Das hier präsentierte Bioreaktorsystem zur Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese ist in der Lage, einen weiten Bereich physiologischer Bedingungen zu erzeugen, die für die Herstellung der Gefäßprothese benötigt werden. Höhere Druckverhältnisse können zur Stabilitätstestung eines Gefäßes zusätzlich erzeugt werden. Es können physiologische Scherstressbedingungen bis zu 20 dyn/cm² bei Verwendung von mit 2,5% MC angedicktem Zellkulturmedium erreicht werden. Ebenso kann ein pulsatiler Druck erzeugt werden, der in einem pulsatilen Volumenstrom resultiert und ebenso für eine Dehnung der Gefäßwand sorgt. Zu diesem Zweck konnten exemplarische Druck- und Flussprofile erstellt werden, die für die Kultivierung einer Gefäßprothese verwendet werden könnten. Für die Analyse metabolischer Parameter konnte ein FIA-System zur sterilen Entnahme von Proben und Messung der Glukosekonzentration erfolgreich in das Bioreaktorsystem integriert werden.

Die Inbetriebnahme des Bioreaktorsystems konnte mit der Neubesiedelung eines dezellularisierten Gefäßes eines Schweines mit HUVECs erfolgreich umgesetzt werden. Unter Verwendung des entwickelten Besiedelungsprotokolls konnte eine konfluente, endotheliale Einzelzellschicht auf der inneren Gefäßseite erfolgreich erzeugt werden. Das Besiedelungsprotokoll kann somit auf zukünftige Besiedelungsansätze einer bioartifiziellen Gefäßprothese übertragen werden. Basierend auf den bei der Charakterisierung des Bioreaktorsystems ermittelten Werten zur Viskosität des Zellkulturmediums und des wirkenden Scherstresses konnte ebenfalls ein Protokoll für eine dynamische Kultivierung bis zu einem Scherstress von 5 dyn/cm² entwickelt werden. Eine Testkultivierung zur Überprüfung muss zukünftig durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wesentliche erste Schritte zur Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese erfolgreich abgeschlossen werden. Im ersten Teil der Arbeit wurden die Polymere PDO und Fibrin für ihre Nutzbarkeit zur Herstellung biohybrider *Scaffolds* charakterisiert und zwei verschiedene PDO-*Scaffold*-Typen erfolgreich hergestellt. Unter Verwendung der 3D-Drucktechnik wurden Test-*Scaffolds* für eine bioartifizielle Gefäßprothese und mit einem Salzlaugungsverfahren makroporöse *Scaffolds* zur Vaskularisierung hergestellt. Beide PDO-*Scaffolds* zeigten eine sehr gute Biokompatibilität nach DIN EN ISO 10993 und mechanische Eigenschaften, welche in einem Bereich liegen, der für die Herstellung von Weichgewebe geeignet ist. Hierbei verfügten die 3D-gedruckten *Scaffolds* über eine deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zu den durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds*. Für die Herstellung biohybrider *Scaffolds* wurden die PDO-*Scaffolds* mit Fibrin dekoriert und in ersten Testbesiedelungen mit einer Mischung aus HUVECs und MSCs erfolgreich besiedelt. Ziel war hierbei einerseits eine durchgängige Zellschicht auf den 3D-gedruckten *Scaffolds*, da eine durchgängige endotheliale Einzelzellschicht auf der Oberfläche des *Scaffolds* notwendig für die Verwendung der Struktur als Gefäßprothese ist (Deanfield et al. 2007; Inoguchi et al. 2007). Andererseits ist ein vollständiger Einwuchs der Zellen in die durch Salzlaugung hergestellten makroporösen *Scaffolds* Voraussetzung für eine komplexe Kapillargefäßbildung. Auf den 3D-gedruckten *Scaffolds* konnte jedoch keine durchgängige Zellschicht erzeugt werden, da die mittels 3D-Druck erstellten Gitterstrukturen noch nicht die für diese Anforderungen notwendige Auflösung und Mikrostrukturierung aufwiesen. Zur Verbesserung der Oberflächenstruktur der 3D-gedruckten *Scaffolds* könnte perspektivisch das bisher eingesetzte Schmelzschichtungsverfahren mit dem Elektrosplennen von geschmolzenen PDO (engl.: *Melt electro spinning writing*) kombiniert werden. Damit könnte eine makroporöse Oberschicht auf einem stabilen, mechanoelastischen Basis-*Scaffold* erzeugt werden, z.B. im Rahmen weiterer wissenschaftlicher Arbeiten unter Verwendung eines technisch ausgereifteren 3D-Druckers. Die besiedelten *Scaffolds*, die durch Salzlaugung hergestellt wurden, zeigten einen optimalen Einwuchs der Zellen in die Poren, jedoch erlaubt das aktuell verwendete Verfahren nicht die Herstellung einer reproduzierbaren inneren Porenstruktur. Dies könnte durch eine Optimierung der Salzpartikel verbessert werden. Hierbei könnten z.B. durch ein spezielles von Liang *et al.* beschriebenes Verfahren gleichmäßigere Salzpartikel für homogenere *Scaffolds* hergestellt und verwendet werden (Liang et al. 2018). Bei der Analyse der Degradation der durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds* konnte gezeigt werden, dass sich diese zwar hinsichtlich ihrer Struktur im Verlauf mehrerer Wochen nicht

verändern, allerdings die mechanische Belastbarkeit stark nachlässt. Interessanterweise ließ sich für die mit Zellen besiedelten makroporösen *Scaffolds* zeigen, dass die Zellen im Verlauf der Kultivierung die mechanischen Eigenschaften der *Scaffolds* wieder herstellen. Dieser Vorgang der Degradation der *Scaffolds* und der Übernahme der mechanischen Eigenschaften der *Scaffolds* durch die Zellen sollte zukünftig detaillierter untersucht werden, um ein genaues Verständnis der mechanischen Belastbarkeit der Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten zu erhalten. Diese Untersuchungen zur Degradation müssen ebenfalls für zukünftig hergestellte 3D-gedruckte *Scaffolds* durchgeführt werden. Eine potentiell zytotoxische Auswirkung der Abbauprodukte von PDO konnte bisher noch nicht festgestellt werden, wobei Tierversuche ausstehen. Eine Methode zur Gewinnung von Fibrinogen aus autologer Quelle wurde ebenfalls erfolgreich etabliert. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass mittels PDO und Fibrin in Kombination ein biohybrides *Scaffold* hergestellt werden konnte, welches sich als Basisstruktur, z.B. zur Erzeugung von Kapillarnestern, eignet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Strategie zur Vaskularisierung der durch Salzlaugung aus PDO hergestellten und mit Fibrin beschichteten biohybriden *Scaffolds* etabliert und optimiert. Eine Vaskularisierung von künstlich erzeugtem Gewebe ist eine zentrale Problemstellung im *Tissue Engineering*, da die Zellen eines neuen Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden müssen. Für die Besiedelung der *Scaffolds* konnte gezeigt werden, dass eine Gesamtzellzahl von 250.000 Zellen/*Scaffold* aus HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 2:3 optimale Ergebnisse hinsichtlich der Vaskularisierung liefert. Die Verwendung von künstlich mit Wachstumsfaktoren angereichertem Zellkulturmedium war im Vergleich zu der Verwendung von konditioniertem Zellkulturmedium aufgrund besserer Reproduzierbarkeit vorteilhaft. Die besten Ergebnisse konnten mit Zellkulturmedium aus einer Mischung aus basalem EGM-2 und α MEM (1:1) mit 2% HS und je 20 ng/mL VEGF, bFGF und Hydrocortison erzielt werden. Ein Lumen innerhalb der gebildeten Strukturen konnte durch Inkubation der besiedelten *Scaffolds* in einer Lösung mit fluoreszenzmarkiertem Dextran nachgewiesen werden. Aus Blut isoliertes Fibrinogen konnte für die Herstellung von biohybriden *Scaffolds* erfolgreich eingesetzt werden und macht die Verwendung autologen Materials somit möglich; ein wichtiger Schritt für die künftige klinische Applikation. Dabei muss allerdings zukünftig die erforderliche Menge des autolog gewonnenen Fibrinogens zur Herstellung der biohybriden *Scaffolds* genau festgelegt werden, da bei der Netzwerkbildung die Menge des entstehenden Fibrins aus dem Vorläufermolekül essentiell ist, und eine Besiedelung der *Scaffolds* ohne MSCs oder Fibrin nicht erfolgreich zu einer Vaskularisierung der *Scaffolds* führte. Die bei der Vaskularisierung gebildeten endothelialen Netzwerkstrukturen konnten mit

der in dieser Arbeit etablierten Methode zuverlässig analysiert werden. Perspektivisch sollten die für die Erzeugung der vaskulären Netzwerke kommerziell erhältlichen HUVECs durch jederzeit autolog verfügbare Endothelzellen ersetzt werden, da einerseits patientenindividuelle HUVECs bei der Geburt konserviert werden müssten und andererseits HUVECs im Vergleich zu anderen endothelialen Zellen nur über eine kurze Lebensspanne verfügen sowie nicht in der Lage sind, eine vollständige Angiogenese abzubilden (Medina-Leyte et al. 2020). Zu diesem Zweck könnten endotheliale Vorläuferzellen minimal invasiv aus dem peripheren Blut isoliert werden (Kraus et al. 2021; Yang et al. 2020). Die 1997 von Asahara *et al.* gezeigte Methodik (Asahara et al. 1997) konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits in einem anderen Promotionsvorhaben optimiert werden (Kraus et al. 2021). Eine Verwendung der endothelialen Vorläuferzellen zur Vaskularisierung der biohybriden *Scaffolds* ist zeitnah geplant. Hierbei müsste analysiert werden, wie sich diese im Vergleich zu den zuvor verwendeten HUVECs verhalten und ob Anpassungen an der Besiedelungs- und Kultivierungsstrategie vorgenommen werden müssen. Ebenso sollte die Netzwerkbildung auf den biohybriden *Scaffolds* über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Hierbei sollte ein besonderer Fokus auf deren Stabilisierung gelegt werden. Zu diesem Zweck könnten neben VEGF und bFGF weitere Wachstumsfaktoren, wie PDGF- β oder Angiopoetin 1 und 2, progressiv in den Kultivierungsprozess integriert werden, die zur weiteren Netzwerkreifung beitragen (Mastrullo et al. 2020; Thurston 2003). Die vaskularisierten biohybriden *Scaffolds* sollten zur Überprüfung der Eignung als Ersatz für Weichgewebe bei kleinen Gewebeerletzungen in Kleintieren, z.B. Ratten, implantiert werden. Allgemein könnten diese erzeugten „Kapillarnester“ perspektivisch neben der Verwendung für die Herstellung der bioartifiziellen Gefäßprothese auch als Element zur Herstellung vieler Weichgewebe im *Tissue Engineering* eingesetzt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde das vorliegende Bioreaktorsystem charakterisiert und optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass das System in der Lage ist, vielfältige physiologische Bedingungen hinsichtlich Druck und Volumenstrom, und daraus resultierendem Scherstress, zur Kultivierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese zu erzeugen. Zu diesem Zweck musste das verwendete Zellkulturmedium mit Methylcellulose angedickt werden. Die Bedingungen konnten unabhängig von der verwendeten tubulären Struktur im Bioreaktorsystem erzeugt werden. Für die Überwachung metabolischer Parameter konnte eine Fließinjektionsanalyse im Bioreaktorsystem integriert werden. Eine erste Kultivierung im Bioreaktorsystem zur Ausbildung einer konfluenten endothelialen Einzelschicht unter quasi-statischen Bedingungen konnte bereits mit einem dezellularisierten Gefäß eines Schweines als tubuläre Teststruktur erfolgreich umgesetzt werden. Somit konnte verifiziert werden, dass das erstellte

Besiedelungsprotokoll zu einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen auf der inneren Oberfläche einer tubulären Gefäßstruktur eingesetzt werden kann. Als nächster Schritt muss nun das vorgeschlagene Kultivierungsprotokoll mit einem finalen Scherstress von 5 dyn/cm² ebenfalls mit einem dezellularisierten Gefäß erprobt werden. Basierend auf diesem Ergebnis müssen weitere Kultivierungsprotokolle mit einem finalen Scherstress von 5-20 dyn/cm² erarbeitet werden, um die technischen Möglichkeiten des Systems voll auszunutzen. Die dynamische Kultivierung würde, wie diskutiert, zum anti-thrombogenen Profil einer künftig generierten Gefäßprothese beitragen (Kraus et al. 2021; Pashneh-Tala et al. 2016; Deanfield et al. 2007).

Insgesamt konnten erste, wichtige Schritte zur Entwicklung einer biotifiziellen Gefäßprothese und deren Kultivierung in einem speziell entwickelten Bioreaktorsystem erfolgreich abgeschlossen werden, die die Grundlage für weitere Entwicklungen darstellen. Hier bestehen bereits ausgearbeitete Konzepte, die in verschiedenen Arbeitspaketen innerhalb der Arbeitsgruppe bearbeitet werden.

7 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

Adolfsson, Karin H.; Sjöberg, Ida; Höglund, Odd V.; Wattle, Ove; Hakkarainen, Minna (2021): In Vivo Versus In Vitro Degradation of a 3D Printed Resorbable Device for Ligation of Vascular Tissue in Horses. In: *Macromolecular bioscience*, e2100164. DOI: 10.1002/mabi.202100164.

Ahlinder, Astrid; Fuoco, Tiziana; Finne-Wistrand, Anna (2018): Medical grade polylactide, copolyesters and polydioxanone: Rheological properties and melt stability. In: *Polymer Testing* 72, S. 214–222. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2018.10.007.

Ahmed, Tamer A. E.; Dare, Emma V.; Hincke, Max (2008): Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 14 (2), S. 199–215. DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0435.

Andrae, Johanna; Gallini, Radiosa; Betsholtz, Christer (2008): Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. In: *Genes & development* 22 (10), S. 1276–1312. DOI: 10.1101/gad.1653708.

Andrée, Birgit; Ichanti, Houda; Kalies, Stefan; Heisterkamp, Alexander; Strauß, Sarah; Vogt, Peter-Maria et al. (2019): Formation of three-dimensional tubular endothelial cell networks under defined serum-free cell culture conditions in human collagen hydrogels. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 5437. DOI: 10.1038/s41598-019-41985-6.

Anovitz, Lawrence M.; Cole, David R. (2015): Characterization and Analysis of Porosity and Pore Structures. In: *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 80 (1), S. 61–164. DOI: 10.2138/rmg.2015.80.04.

Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T. et al. (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302), S. 964–967. DOI: 10.1126/science.275.5302.964.

Au, Patrick; Tam, Joshua; Fukumura, Dai; Jain, Rakesh K. (2008): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. In: *Blood* 111 (9), S. 4551–4558. DOI: 10.1182/blood-2007-10-118273.

Baguneid, M. S.; Seifalian, A. M.; Salacinski, H. J.; Murray, D.; Hamilton, G.; Walker, M. G. (2006): Tissue engineering of blood vessels. In: *The British journal of surgery* 93 (3), S. 282–290. DOI: 10.1002/bjs.5256.

- Balaji, Swathi; King, Alice; Crombleholme, Timothy M.; Keswani, Sundeep G. (2013): The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. In: *Advances in wound care* 2 (6), S. 283–295. DOI: 10.1089/wound.2012.0398.
- Bank, Alan J.; Kaiser, Daniel R. (2002): Arterial Wall Mechanics. In: Peter Lanzer und Eric J. Topol (Hg.): *Pan Vascular Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 151–161.
- Bayir, Ece; Sahinler, Mert; Celtikoglu, M. Mert; Sendemir, Aylin (2020): Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment. In: *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*: Elsevier, S. 709–752.
- Belinskaia, Daria A.; Voronina, Polina A.; Batalova, Anastasia A.; Goncharov, Nikolay V. (2021): Serum Albumin. In: *Encyclopedia* 1 (1), S. 65–75. DOI: 10.3390/encyclopedia1010009.
- Bindal, Aditya; Narsimhan, Ganesan; Hem, Stanley L.; Kulshreshtha, Alok (2007): Structural changes in xanthan gum solutions during steam sterilization for sterile preparations. In: *Pharmaceutical development and technology* 12 (2), S. 159–167. DOI: 10.1080/10837450701212545.
- Feinmechanik und Optik (NAFuO) 10993-5:2009, Oktober 2009: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 5.
- Blinder, Yaron J.; Freiman, Alina; Raindel, Noa; Mooney, David J.; Levenberg, Shulamit (2015): Vasculogenic dynamics in 3D engineered tissue constructs. In: *Scientific reports* 5, S. 17840. DOI: 10.1038/srep17840.
- Boland, Eugene D.; Coleman, Branch D.; Barnes, Catherine P.; Simpson, David G.; Wnek, Gary E.; Bowlin, Gary L. (2005): Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. In: *Acta biomaterialia* 1 (1), S. 115–123. DOI: 10.1016/j.actbio.2004.09.003.
- Bray, Sarah J. (2006): Notch signalling: a simple pathway becomes complex. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (9), S. 678–689. DOI: 10.1038/nrm2009.
- Bremnes, Roy M.; Camps, Carlos; Sirera, Rafael (2006): Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 51 (2), S. 143–158. DOI: 10.1016/j.lungcan.2005.09.005.

- Bulygina, Inna; Senatov, Fedor; Choudhary, Rajan; Kolesnikov, Evgeniy; Kaloshkin, Sergey; Scholz, Ronja et al. (2020): Biomimetic scaffold fabricated with a mammalian trabecular bone template. In: *Polymer Degradation and Stability* 172, S. 109076. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109076.
- Cao, Yi; Gong, Yu; Liu, Liangliang; Zhou, Yiwei; Fang, Xin; Zhang, Cao et al. (2017): The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. In: *Journal of applied toxicology : JAT* 37 (12), S. 1359–1369. DOI: 10.1002/jat.3470.
- Carmeliet, P.; Jain, R. K. (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. In: *Nature* 407 (6801), S. 249–257. DOI: 10.1038/35025220.
- Carmeliet, Peter (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. In: *Oncology* 69 Suppl 3, S. 4–10. DOI: 10.1159/000088478.
- Carrabba, Michele; Madeddu, Paolo (2018): Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6, S. 41. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00041.
- Chen, G.; Kawazoe, N. (2016): Preparation of polymer-based porous scaffolds for tissue engineering. In: Paul Tomlins (Hg.): *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. Preparation of polymer-based porous scaffolds for tissue engineering: Elsevier, S. 105–125.
- Chlupáč, J.; Filová, E.; Bačáková, L. (2009): Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. In: *Physiological research* 58 Suppl 2, S119-S140. DOI: 10.33549/physiolres.931918.
- Coenen, Anna M. J.; Bernaerts, Katrien V.; Harings, Jules A. W.; Jockenhoevel, Stefan; Ghazanfari, Samaneh (2018): Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. In: *Acta biomaterialia* 79, S. 60–82. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.08.027.
- Coogan, Kasie R.; Stone, Payton T.; Sempertegui, Nicole D.; Rao, Shreyas S. (2020): Fabrication of micro-porous hyaluronic acid hydrogels through salt leaching. In: *European Polymer Journal* 135, S. 109870. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109870.
- Dardik, Alan; Chen, Leiling; Frattini, Jared; Asada, Hidenori; Aziz, Faisal; Kudo, Fabio A.; Sumpio, Bauer E. (2005): Differential effects of orbital and laminar shear stress on

endothelial cells. In: *Journal of vascular surgery* 41 (5), S. 869–880. DOI: 10.1016/j.jvs.2005.01.020.

Davis, George E.; Stratman, Amber N.; Sacharidou, Anastasia; Koh, Wonshill (2011): Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. In: *International review of cell and molecular biology* 288, S. 101–165. DOI: 10.1016/B978-0-12-386041-5.00003-0.

Deanfield, John E.; Halcox, Julian P.; Rabelink, Ton J. (2007): Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. In: *Circulation* 115 (10), S. 1285–1295. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.

Deans, Robert J.; Moseley, Annemarie B. (2000): Mesenchymal stem cells. In: *Experimental Hematology* 28 (8), S. 875–884. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00482-3.

Dhandayuthapani, Brahatheeswaran; Yoshida, Yasuhiko; Maekawa, Toru; Kumar, D. Sakthi (2011): Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. In: *International Journal of Polymer Science* 2011, S. 1–19. DOI: 10.1155/2011/290602.

Diamantouros, Stefanos E.; Hurtado-Aguilar, Luis G.; Schmitz-Rode, Thomas; Mela, Petra; Jockenhoevel, Stefan (2013): Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts. In: *Ann Biomed Eng* 41 (9), S. 1979–1989. DOI: 10.1007/s10439-013-0823-5.

Dietrich, Maren; Heselhaus, Johanna; Wozniak, Justyna; Weinandy, Stefan; Mela, Petra; Tschoeke, Beate et al. (2013): Fibrin-based tissue engineering: comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 (3), S. 216–226. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0473.

Ding, Ivan; Peterson, Amy M. (2021): Half-life modeling of basic fibroblast growth factor released from growth factor-eluting polyelectrolyte multilayers. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 9808. DOI: 10.1038/s41598-021-89229-w.

Druecke, Daniel; Langer, Stefan; Lamme, Evert; Pieper, Jeroen; Ugarkovic, Marija; Steinau, Hans Ulrich; Homann, Heinz Herbert (2004): Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 68 (1), S. 10–18. DOI: 10.1002/jbm.a.20016.

Eberth, John F. (2020): Pulsatile Perfusion Bioreactor for Mimicking, Controlling, and Optimizing Blood Vessel Mechanics. Angemeldet durch University of South Carolina am 19.02.2020. Anmeldenr: 16/794603. Veröffentlichungsnr: US 2016/0298073 A1.

Encyclopædia Britannica - The blood vessels (Hg.): Encyclopædia Britannica. The blood vessels. Encyclopædia Britannica, Inc. Online verfügbar unter <https://www.britannica.com/science/human-cardiovascular-system/The-blood-vessels>, zuletzt geprüft am 29.07.2021.

Encyclopædia Britannica - Transverse section of an artery (Hg.): Encyclopædia Britannica - Transverse section of an artery. Encyclopædia Britannica. Online verfügbar unter <https://www.britannica.com/science/tunica-media#/media/1/609168/121565>, zuletzt geprüft am 30.07.2021.

European Commission (Hg.) (2017): EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4. Good Manufacturing Practice. European Commission. Online verfügbar unter https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_de, zuletzt aktualisiert am 22.11.2017, zuletzt geprüft am 09.09.2021.

Eyre, Katerina; Samper, Esther; Haverich, Axel; Hilfiker, Andres; Andrée, Birgit (2021): Re-endothelialization of non-detergent decellularized porcine vessels. In: *Artif. Organs*. 45 (4), E53-E64. DOI: 10.1111/aor.13836.

Feng, Bai; Jinkang, Zhang; Zhen, Wang; Jianxi, Lu; Jiang, Chang; Jian, Liu et al. (2011): The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 6 (1), S. 15007. DOI: 10.1088/1748-6041/6/1/015007.

Fioretta, Emanuela S.; Boehmer, Lisa von; Generali, Melanie; Hoerstrup, Simon P.; Emmert, Maximilian Y. (2020): Off-the-Shelf Tissue-Engineered Vascular Conduits: Clinical Translation. In: Beat H. Walpoth, Helga Bergmeister, Gary L. Bowlin, Deling Kong, Joris I. Rotmans und Peter Zilla (Hg.): *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. Cham: Springer International Publishing, S. 489–531.

Franke, Jana; Abs, Vanessa; Zizzadoro, Claudia; Abraham, Getu (2014): Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. In: *BMC veterinary research* 10, S. 119. DOI: 10.1186/1746-6148-10-119.

- Freiman, Alina; Shandalov, Yulia; Rosenfeld, Dekel; Shor, Erez; Ben-David, Dror; Meretzki, Shai et al. (2018): Engineering vascularized flaps using adipose-derived microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12 (1), e130-e141. DOI: 10.1002/term.2436.
- Fries, Dietmar; Bachler, Mirjam; Hermann, Martin (2016): Fibrinogen (FI). In: Günter Singbartl und Kai Singbartl (Hg.): *Transfusionsassoziierte Pharmakotherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 171–184.
- Garg, P.; Ashutosh; Nagarth, H.; Pahuja, M.; Goyal, S.; Kaur, R. K.; Singh, S. (2013): Bioabsorbable Implant Materials: A Review. In: *Journal of Advanced Medical and Dental Science Research* (1(2)), S. 83–85. Online verfügbar unter <http://jamdsr.com/>, zuletzt geprüft am 18.08.2021.
- Goding, Ann M. (2009): Research Article: The Effect of Hydrocortisone on Angiogenesis. In: *BIOS* 80 (2), S. 59–65. DOI: 10.1893/011.080.0202.
- Goonoo, Newsheen; Jeetah, Rubeena; Bhaw-Luximon, Archana; Jhurry, Dhanjay (2015): Polydioxanone-based bio-materials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. In: *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 97 (Pt B), S. 371–391. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.024.
- Gupta, Prerak; Kumar, Manishekhar; Bhardwaj, Nandana; Kumar, Jadi Praveen; Krishnamurthy, C. S.; Nandi, Samit Kumar; Mandal, Biman B. (2016): Mimicking Form and Function of Native Small Diameter Vascular Conduits Using Mulberry and Non-mulberry Patterned Silk Films. In: *ACS applied materials & interfaces* 8 (25), S. 15874–15888. DOI: 10.1021/acsami.6b00783.
- Hahn, Cornelia; Schwartz, Martin A. (2009): Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (1), S. 53–62. DOI: 10.1038/nrm2596.
- Hahn, Mariah S.; McHale, Melissa K.; Wang, Eva; Schmedlen, Rachael H.; West, Jennifer L. (2007): Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts. In: *Ann Biomed Eng* 35 (2), S. 190–200. DOI: 10.1007/s10439-006-9099-3.

- Hakimi, O.; Murphy, R.; Stachewicz, U.; Hislop, S.; Carr, A. J. (2012): An electrospun polydioxanone patch for the localisation of biological therapies during tendon repair. In: *European cells & materials* 24, 344-57; discussion 357. DOI: 10.22203/ecm.v024a25.
- Heene, Sebastian; Thoms, Stefanie; Kalies, Stefan; Wegner, Nils; Peppermüller, Pia; Born, Nikolai et al. (2021): Vascular Network Formation on Macroporous Polydioxanone Scaffolds. In: *Tissue engineering. Part A*. DOI: 10.1089/ten.tea.2020.0232.
- Heit, John A. (2013): Thrombophilia. In: *Consultative Hemostasis and Thrombosis*: Elsevier, S. 205–239.
- Herbert, Shane P.; Stainier, Didier Y. R. (2011): Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (9), S. 551–564. DOI: 10.1038/nrm3176.
- Hodder, Ella; Duin, Sarah; Kilian, David; Ahlfeld, Tilman; Seidel, Julia; Nachtigall, Carsten et al. (2019): Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 30 (1), S. 10. DOI: 10.1007/s10856-018-6211-9.
- Hollister, Scott J. (2009): Scaffold engineering: a bridge to where? In: *Biofabrication* 1 (1), S. 12001. DOI: 10.1088/1758-5082/1/1/012001.
- Huang, Angela Hai; Lee, Yong-Ung; Calle, Elizabeth A.; Boyle, Michael; Starcher, Barry C.; Humphrey, Jay D.; Niklason, Laura E. (2015): Design and Use of a Novel Bioreactor for Regeneration of Biaxially Stretched Tissue-Engineered Vessels. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 21 (8), S. 841–851. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0287.
- Inoguchi, Hiroyuki; Tanaka, Takashi; Maehara, Yoshihiko; Matsuda, Takehisa (2007): The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. In: *Biomaterials* 28 (3), S. 486–495. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.020.
- Jafari, Maissa; Paknejad, Zahrasadat; Rad, Maryam Rezai; Motamedian, Saeed Reza; Eghbal, Mohammad Jafar; Nadjmi, Nasser; Khojasteh, Arash (2017): Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 105 (2), S. 431–459. DOI: 10.1002/jbm.b.33547.

- Jessica I. Gupta; Michael J. Shea (2019): MSD Manual (Consumer Version). Biology of the Blood Vessels. Hg. v. Robert S. Porter. Merck & Co. Inc. Online verfügbar unter <https://www.msdmanuals.com/home/heart-and-blood-vessel-disorders/biology-of-the-heart-and-blood-vessels/biology-of-the-blood-vessels>, zuletzt aktualisiert am April 2019, zuletzt geprüft am 02.08.2021.
- Kalfa, David; Bel, Alain; Chen-Tournoux, Annabel; Della Martina, Alberto; Rochereau, Philippe; Coz, Cyrielle et al. (2010): A polydioxanone electrospun valved patch to replace the right ventricular outflow tract in a growing lamb model. In: *Biomaterials* 31 (14), S. 4056–4063. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.135.
- Kang, Tae-Yun; Hong, Jung Min; Kim, Bum Jin; Cha, Hyung Joon; Cho, Dong-Woo (2013): Enhanced endothelialization for developing artificial vascular networks with a natural vessel mimicking the luminal surface in scaffolds. In: *Acta biomaterialia* 9 (1), S. 4716–4725. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.042.
- Kelley, C.; D'Amore, P.; Hechtman, H. B.; Shepro, D. (1987): Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. In: *The Journal of Cell Biology* 104 (3), S. 483–490. DOI: 10.1083/jcb.104.3.483.
- Koch, Sabine; Flanagan, Thomas C.; Sachweh, Joerg S.; Tanios, Fadwa; Schnoering, Heike; Deichmann, Thorsten et al. (2010): Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. In: *Biomaterials* 31 (17), S. 4731–4739. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.051.
- Kraus, Xenia; Pflaum, Michael; Thoms, Stefanie; Jonczyk, Rebecca; Witt, Martin; Scheper, Thomas; Blume, Cornelia (2021): A pre-conditioning protocol of peripheral blood derived endothelial colony forming cells for endothelialization of tissue engineered constructs. In: *Microvascular research* 134, S. 104107. DOI: 10.1016/j.mvr.2020.104107.
- Kreszinger, Mario; Toholj, Bojan; Ačanski, Aleksandar; Baloš, Sebastijan; Cincović, Marko; Pećin, Marko et al. (2018): Tensile strength retention of resorptive suture materials applied in the stomach wall - an in vitro study. In: *Vet. arhiv* 88 (2), S. 235–243. DOI: 10.24099/vet.arhiv.170130.
- Lawson, Jeffrey H.; Glickman, Marc H.; Ilzecki, Marek; Jakimowicz, Tomasz; Jaroszynski, Andrzej; Peden, Eric K. et al. (2016): Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials. In: *The Lancet* 387 (10032), S. 2026–2034. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00557-2.

- LEHOUX, S.; CASTIER, Y.; TEDGUI, A. (2006): Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. In: *J Intern Med* 259 (4), S. 381–392.
- Lesman, Ayelet; Koffler, Jacob; Atlas, Roe; Blinder, Yaron J.; Kam, Zvi; Levenberg, Shulamit (2011): Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. In: *Biomaterials* 32 (31), S. 7856–7869. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.003.
- Levenberg, Shulamit; Golub, Justin S.; Amit, Michal; Itskovitz-Eldor, Joseph; Langer, Robert (2002): Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7), S. 4391–4396. DOI: 10.1073/pnas.032074999.
- Levenberg, Shulamit; Rouwkema, Jeroen; Macdonald, Mara; Garfein, Evan S.; Kohane, Daniel S.; Darland, Diane C. et al. (2005): Engineering vascularized skeletal muscle tissue. In: *Nature biotechnology* 23 (7), S. 879–884. DOI: 10.1038/nbt1109.
- Li, Yi-Shuan J.; Haga, Jason H.; Chien, Shu (2005): Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. In: *Journal of biomechanics* 38 (10), S. 1949–1971. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.09.030.
- Liang, Xiangyu; Qi, Yongli; Pan, Zhen; He, Yao; Liu, Xiangnan; Cui, Shuquan; Ding, Jiandong (2018): Design and preparation of quasi-spherical salt particles as water-soluble porogens to fabricate hydrophobic porous scaffolds for tissue engineering and tissue regeneration. In: *Mater. Chem. Front.* 2 (8), S. 1539–1553. DOI: 10.1039/C8QM00152A.
- Liu, Huinan; Slamovich, Elliott B.; Webster, Thomas J. (2006): Less harmful acidic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition. In: *International Journal of Nanomedicine* 1 (4), S. 541–545.
- Liu, Kun; Li, Wenyan; Chen, Shitian; Wen, Wei; Lu, Lu; Liu, Mingxian et al. (2020): The design, fabrication and evaluation of 3D printed gHNTs/gMgO whiskers/PLLA composite scaffold with honeycomb microstructure for bone tissue engineering. In: *Composites Part B: Engineering* 192, S. 108001. DOI: 10.1016/j.compositesb.2020.108001.
- Liu, Linqi; Gao, Jianhua; Yuan, Yi; Chang, Qiang; Liao, Yunjun; Lu, Feng (2013): Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. In: *Cell biology international* 37 (6), S. 551–560. DOI: 10.1002/cbin.10097.

- Liu, Xian; Chen, Wenchuan; Zhang, Chi; Thein-Han, Wahwah; Hu, Kevin; Reynolds, Mark A. et al. (2017): Co-Seeding Human Endothelial Cells with Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells on Calcium Phosphate Scaffold Enhances Osteogenesis and Vascularization in Rats. In: *Tissue engineering. Part A* 23 (11-12), S. 546–555. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0485.
- Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. (2005): Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. In: *Nature biotechnology* 23 (1), S. 47–55. DOI: 10.1038/nbt1055.
- Maat, Moniek P. M. de; Verschuur, Maartje (2005): Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited. In: *Current opinion in hematology* 12 (5), S. 377–383. DOI: 10.1097/01.moh.0000169287.51594.3b.
- Mastrullo, Valeria; Cathery, William; Velliou, Eirini; Madeddu, Paolo; Campagnolo, Paola (2020): Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 188. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00188.
- Matsuzaki, Yuichi; John, Kelly; Shoji, Toshihiro; Shinoka, Toshiharu (2019): The Evolution of Tissue Engineered Vascular Graft Technologies: From Preclinical Trials to Advancing Patient Care. In: *Applied sciences (Basel, Switzerland)* 9 (7). DOI: 10.3390/app9071274.
- McFadden, T. M.; Duffy, G. P.; Allen, A. B.; Stevens, H. Y.; Schwarzmaier, S. M.; Plesnila, N. et al. (2013): The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen-glycosaminoglycan scaffold in vivo. In: *Acta biomaterialia* 9 (12), S. 9303–9316. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.014.
- Medina-Leyte, Diana J.; Domínguez-Pérez, Mayra; Mercado, Ingrid; Villarreal-Molina, María T.; Jacobo-Albavera, Leonor (2020): Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. In: *Applied Sciences* 10 (3), S. 938. DOI: 10.3390/app10030938.
- Melchiorri, Anthony J.; Bracaglia, Laura G.; Kimerer, Lucas K.; Hibino, Narutoshi; Fisher, John P. (2016): In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 22 (7), S. 663–670. DOI: 10.1089/ten.tec.2015.0562.
- Merolli, Antonio; Joyce, Thomas J. (2009): *Biomaterials in Hand Surgery*. Milano: Springer Milan.

- Micklavzina, Benjamin L.; Metaxas, Athena E.; Dutcher, Cari S. (2020): Microfluidic rheology of methylcellulose solutions in hyperbolic contractions and the effect of salt in shear and extensional flows. In: *Soft Matter* 16 (22), S. 5273–5281. DOI: 10.1039/D0SM00371A.
- Molea, G.; Schonauer, F.; Bifulco, G.; D'Angelo, D. (2000): Comparative study on biocompatibility and absorption times of three absorbable monofilament suture materials (Polydioxanone, Poliglecaprone 25, Glycomer 631). In: *British journal of plastic surgery* 53 (2), S. 137–141. DOI: 10.1054/bjps.1999.3247.
- Morozova, Svetlana; Schmidt, Peter W.; Metaxas, Athena; Bates, Frank S.; Lodge, Timothy P.; Dutcher, Cari S. (2018): Extensional Flow Behavior of Methylcellulose Solutions Containing Fibrils. In: *ACS Macro Lett.* 7 (3), S. 347–352. DOI: 10.1021/acsmacrolett.8b00042.
- Munarin, Fabiola; Bozzini, Sabrina; Visai, Livia; Tanzi, Maria C.; Petrini, Paola (2013): Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin. In: *Food Hydrocolloids* 31 (1), S. 74–84. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.09.017.
- Murphy, Ciara M.; Haugh, Matthew G.; O'Brien, Fergal J. (2010): The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. In: *Biomaterials* 31 (3), S. 461–466. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- Niklason, L. E.; Gao, J.; Abbott, W. M.; Hirschi, K. K.; Houser, S.; Marini, R.; Langer, R. (1999): Functional arteries grown in vitro. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5413), S. 489–493. DOI: 10.1126/science.284.5413.489.
- O'Brien, F. J.; Harley, B. A.; Yannas, I. V.; Gibson, L. J. (2005): The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. In: *Biomaterials* 26 (4), S. 433–441. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.052.
- O'Brien, Fergal J. (2011): Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. In: *Materials Today* 14 (3), S. 88–95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- Ovsianikov, Aleksandr; Khademhosseini, Ali; Mironov, Vladimir (2018): The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. In: *Trends in biotechnology* 36 (4), S. 348–357. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.01.005.

- Papaioannou, Theodoros G.; Stefanadis, Christodoulos (2005): Vascular wall shear stress: basic principles and methods. In: *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 46 (1), S. 9–15.
- Papandreou, Ioanna; Cairns, Rob A.; Fontana, Lucrezia; Lim, Ai Lin; Denko, Nicholas C. (2006): HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. In: *Cell metabolism* 3 (3), S. 187–197. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.01.012.
- Park, Ho-Jin; Zhang, Yali; Georgescu, Serban P.; Johnson, Kristin L.; Kong, Dequon; Galper, Jonas B. (2006): Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. In: *Stem cell reviews* 2 (2), S. 93–102. DOI: 10.1007/s12015-006-0015-x.
- Pashneh-Tala, Samand; MacNeil, Sheila; Claeysens, Frederik (2016): The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 22 (1), S. 68–100. DOI: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
- PEI (2019): Was sind ATMP? Hg. v. Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel. Online verfügbar unter <https://www.pei.de/SharedDocs/FAQs/DE/atmp/1-was-sind-atmp.html>, zuletzt aktualisiert am 02.10.2019, zuletzt geprüft am 09.09.2021.
- Pill, Karoline; Hofmann, Sandra; Redl, Heinz; Holnthoner, Wolfgang (2015): Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. In: *Cell regeneration (London, England)* 4, S. 8. DOI: 10.1186/s13619-015-0025-8.
- Pillai, Chennakkattu Krishna Sadasivan; Sharma, Chandra P. (2010): Review paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. In: *Journal of biomaterials applications* 25 (4), S. 291–366. DOI: 10.1177/0885328210384890.
- Plunkett, Niamh; O'Brien, Fergal J. (2011): Bioreactors in tissue engineering. In: *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine* 19 (1), S. 55–69. DOI: 10.3233/THC-2011-0605.
- Polak, Julia M.; Bishop, Anne E. (2006): Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, S. 352–366. DOI: 10.1196/annals.1346.001.

- Prim, David A.; Potts, Jay D.; Eberth, John F. (2018): Pulsatile Perfusion Bioreactor for Biomimetic Vascular Impedances. In: *Journal of Medical Devices* 12 (4). DOI: 10.1115/1.4040648.
- PromoCell GmbH: Endothelial Cell Media/Media 2. Instruction Manual. Hg. v. PromoCell GmbH. Online verfügbar unter <https://promocell.com/wp-content/uploads/product-information/manual/C-22011.pdf>, zuletzt geprüft am 08.09.2021.
- Pugsley, M. K.; Tabrizchi, R. (2000): The vascular system. An overview of structure and function. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44 (2), S. 333–340. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00125-8.
- Rao, Rameshwar R.; Peterson, Alexis W.; Ceccarelli, Jacob; Putnam, Andrew J.; Stegemann, Jan P. (2012): Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. In: *Angiogenesis* 15 (2), S. 253–264. DOI: 10.1007/s10456-012-9257-1.
- Ray, J. A.; Doddi, N.; Regula, D.; Williams, J. A.; Melveger, A. (1981): Polydioxanone (PDS), a novel monofilament synthetic absorbable suture. In: *Surgery, gynecology & obstetrics* 153 (4), S. 497–507.
- Risau, W.; Flamme, I. (1995): Vasculogenesis. In: *Annual review of cell and developmental biology* 11, S. 73–91. DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- Ritman, Erik L.; Lerman, Amir (2007): The Dynamic Vasa Vasorum. In: *Cardiovascular research* 75 (4), S. 649–658. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.06.020.
- RKI (2011): Dampf-Sterilisation von Medizinprodukten. Hg. v. Robert Koch Institut. Robert Koch Institut. Online verfügbar unter https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhaushyg/Aufber_Medizinprod/FAQ_03.html, zuletzt aktualisiert am 19.10.2011, zuletzt geprüft am 09.09.2021.
- Robinson, Meghan; Douglas, Sarah; Michelle Willerth, Stephanie (2017): Mechanically stable fibrin scaffolds promote viability and induce neurite outgrowth in neural aggregates derived from human induced pluripotent stem cells. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 6250. DOI: 10.1038/s41598-017-06570-9.
- Rouwkema, Jeroen; Khademhosseini, Ali (2016): Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. In: *Trends in biotechnology* 34 (9), S. 733–745. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.

- Sabino, Marcos A.; Albuerne, Julio; Müller, Alejandro J.; Brisson, José; Prud'homme, Robert E. (2004): Influence of in vitro hydrolytic degradation on the morphology and crystallization behavior of poly(p-dioxanone). In: *Biomacromolecules* 5 (2), S. 358–370. DOI: 10.1021/bm034367i.
- Sacchetti, Benedetto; Funari, Alessia; Remoli, Cristina; Giannicola, Giuseppe; Kogler, Gesine; Liedtke, Stefanie et al. (2016): No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. In: *Stem cell reports* 6 (6), S. 897–913. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.011.
- Schulte, Julia; Friedrich, Anja; Hollweck, Trixi; König, Fabian; Eblenkamp, Markus; Beiras-Fernandez, Andres et al. (2014): A Novel Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering. In: *Processes* 2 (3), S. 526–547. DOI: 10.3390/pr2030526.
- Senatov, Fedor; Amanbek, Gulbanu; Orlova, Polina; Bartov, Mikhail; Grunina, Tatyana; Kolesnikov, Evgeniy et al. (2020): Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery. In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 111, S. 110750. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110750.
- Shahoud, James S.; Sanvictores, Terrence; Aeddula, Narothama R. (2021): StatPearls. Physiology, Arterial Pressure Regulation. Treasure Island (FL).
- Shibuya, Masabumi (2011): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. In: *Genes & cancer* 2 (12), S. 1097–1105. DOI: 10.1177/1947601911423031.
- Shields, Ryan A.; Davila, Jose; Schachar, Ira H. (2019): In Vitro Degradation of Human Vascular Endothelial Growth Factor. Investigative Ophthalmology & Visual Science. In: *ARVO Annual Meeting Abstract 2019* (2019;60(9):5375).
- Shin'oka, Toshiharu; Matsumura, Goki; Hibino, Narutoshi; Naito, Yuji; Watanabe, Manabu; Konuma, Takeshi et al. (2005): Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 129 (6), S. 1330–1338. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2004.12.047.
- Stanislowski, Nils; Cholewa, Fabian; Heymann, Henrik; Kraus, Xenia; Heene, Sebastian; Witt, Martin et al. (2020): Automated Bioreactor System for the Cultivation of Autologous Tissue-Engineered Vascular Grafts. In: *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology*

Society. Annual International Conference 2020, S. 2257–2261. DOI:

10.1109/EMBC44109.2020.9175340.

Strilić, Boris; Kucera, Tomás; Eglinger, Jan; Hughes, Michael R.; McNagny, Kelly M.;

Tsukita, Sachiko et al. (2009): The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. In: *Developmental Cell* 17 (4), S. 505–515. DOI:

10.1016/j.devcel.2009.08.011.

Sugiura, Tadahisa; Matsumura, Goki; Miyamoto, Shinka; Miyachi, Hideki; Breuer, Christopher K.; Shinoka, Toshiharu (2018): Tissue-engineered Vascular Grafts in Children With Congenital Heart Disease: Intermediate Term Follow-up. In: *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 30 (2), S. 175–179. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2018.02.002.

Sun, Xuetao; Altalhi, Wafa; Nunes, Sara S. (2016): Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. In: *Advanced drug delivery reviews* 96, S. 183–194. DOI: 10.1016/j.addr.2015.06.001.

Tamay, Dilara Goksu; Dursun Usal, Tugba; Alagoz, Ayse Selcen; Yucel, Deniz; Hasirci, Nesrin; Hasirci, Vasif (2019): 3D and 4D Printing of Polymers for Tissue Engineering Applications. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7, S. 164. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00164.

Terasawa, Fumiko; Ikeda, Minami; Arai, Shinpei; Okumura, Nobuo (2014): Polymorphism frequency of fibrinogen B β -chain 448Arg and Lys, and the differences of plasma fibrinogen level and clotting function with three genotypes in Japanese. In: *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology* 62 (12), S. 1185–1190.

Thoms, Stefanie (2019): Kultivierungsstrategien zur Entwicklung bioartifizierlicher Gefäßprothesen. Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover. Institut für Technische Chemie.

Thurston, Gavin (2003): Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. In: *Cell and tissue research* 314 (1), S. 61–68. DOI: 10.1007/s00441-003-0749-6.

Tillman, Bryan W.; Yazdani, Saami K.; Lee, Sang Jin; Geary, Randolph L.; Atala, Anthony; Yoo, James J. (2009): The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. In: *Biomaterials* 30 (4), S. 583–588. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.006.

Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers (2014): Elsevier.

Tomlins, P.; Grant, P.; Mikhalovsky, S.; James, S.; Mikhalovska, L. (2004): Measurement of Pore Size and Porosity of Tissue Scaffolds. In: *J. ASTM Int.* 1 (1), S. 11510. DOI: 10.1520/JAI11510.

Tomlins, Paul (Hg.) (2016): Characterisation and Design of Tissue Scaffolds. Preparation of polymer-based porous scaffolds for tissue engineering: Elsevier.

Turnbull, Gareth; Clarke, Jon; Picard, Frédéric; Riches, Philip; Jia, Luanluan; Han, Fengxuan et al. (2018): 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. In: *Bioactive materials* 3 (3), S. 278–314. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.

van der Valk, Jan; Bieback, Karen; Buta, Christiane; Cochrane, Brett; Dirks, Wilhelm G.; Fu, Jianan et al. (2018): Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. In: *ALTEX* 35 (1), S. 99–118. DOI: 10.14573/altex.1705101.

van Lith, Robert; Ameer, Guillermo A. (2011): Biohybrid Strategies for Vascular Grafts. In: Norbert Pallua und Christoph V. Suscheck (Hg.): Tissue Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 279–316.

Viallard, Claire; Larrivé, Bruno (2017): Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. In: *Angiogenesis* 20 (4), S. 409–426. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.

Walpoth, Beat H.; Bergmeister, Helga; Bowlin, Gary L.; Kong, Deling; Rotmans, Joris I.; Zilla, Peter (2020): Tissue-Engineered Vascular Grafts. Cham: Springer International Publishing.

Weinberg, C. B.; Bell, E. (1986): A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 231 (4736), S. 397–400. DOI: 10.1126/science.2934816.

Weisel, John W.; Litvinov, Rustem I. (2017): Fibrin Formation, Structure and Properties. In: *Sub-cellular biochemistry* 82, S. 405–456. DOI: 10.1007/978-3-319-49674-0_13.

WHO (2020): The top 10 causes of death. WHO's Global Health Estimates. Hg. v. WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, zuletzt aktualisiert am 09.12.2020, zuletzt geprüft am 29.08.2021.

Wolf, Frederic; Rojas González, Diana M.; Steinseifer, Ulrich; Obdenbusch, Markus; Herfs, Werner; Brecher, Christian et al. (2018): VascoTrainer: A Mobile and Disposable Bioreactor

System for the Conditioning of Tissue-Engineered Vascular Grafts. In: *Annals of biomedical engineering* 46 (4), S. 616–626. DOI: 10.1007/s10439-018-1977-y.

Wu, K. K.; Thiagarajan, P. (1996): Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. In: *Annual review of medicine* 47, S. 315–331. DOI: 10.1146/annurev.med.47.1.315.

Yang, Guang; Mahadik, Bhushan; Choi, Ji Young; Fisher, John P. (2020): Vascularization in tissue engineering: fundamentals and state-of-art. In: *Progress in biomedical engineering (Bristol, England)* 2 (1). DOI: 10.1088/2516-1091/ab5637.

Zeltinger, J.; Sherwood, J. K.; Graham, D. A.; Müller, R.; Griffith, L. G. (2001): Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. In: *Tissue engineering* 7 (5), S. 557–572. DOI: 10.1089/107632701753213183.

Zhang, Hongbo; Zhou, Li; Zhang, Wenjun (2014a): Control of scaffold degradation in tissue engineering: a review. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 20 (5), S. 492–502. DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0452.

Zhang, Qin; Lu, Hongxu; Kawazoe, Naoki; Chen, Guoping (2014b): Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. In: *Acta biomaterialia* 10 (5), S. 2005–2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.042.

Zhao, Peng; Gu, Haibing; Mi, Haoyang; Rao, Chengchen; Fu, Jianzhong; Turng, Lih-sheng (2018): Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. In: *Front. Mech. Eng.* 13 (1), S. 107–119. DOI: 10.1007/s11465-018-0496-8.

Ziyad, Safiyyah; Iruela-Arispe, M. Luisa (2011): Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. In: *Genes & cancer* 2 (12), S. 1085–1096. DOI: 10.1177/1947601911432334.

Zudaire, Enrique; Gambardella, Laure; Kurcz, Christopher; Vermeren, Sonja (2011): A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. In: *PloS one* 6 (11), e27385. DOI: 10.1371/journal.pone.0027385.

8 Anhang

In diesem Abschnitt werden alle zusätzlichen Daten präsentiert und ebenso alle während der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Programme aufgelistet.

8.1 Zusätzliche experimentelle Daten

8.1.1 PDO-Degradation durch Erhitzen

Die Ergebnisse der Analyse der thermischen Degradation von PDO sind in Abbildung 43 dargestellt.

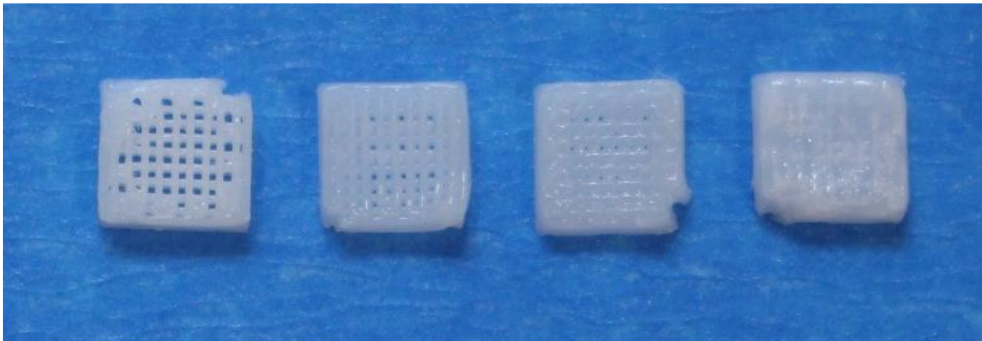


Abbildung 43: Auswirkungen der thermischen Degradation auf den Druck einer PDO-Teststruktur. Eine identische Teststruktur wurde unter gleichen Bedingungen nach 30, 60, 90 und 120 min (von links nach rechts) konstanten Erhitzens des PDO auf 130 °C gedruckt.

8.1.2 Test auf bakterielle Kontamination - qPCR-Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten qPCR zum Nachweis einer bakteriellen Kontamination sind in Abbildung 44 dargestellt.

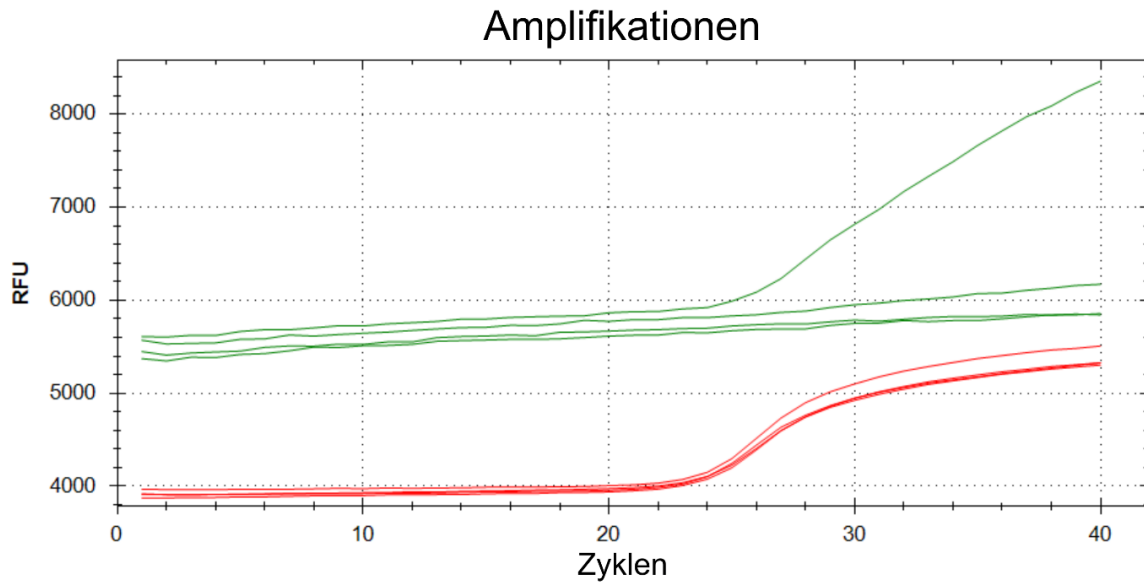


Abbildung 44: Relatives Fluoreszenzsignal der zur Analyse auf eine bakterielle Kontamination mittels qPCR aufgetragenen Proben des Zellkulturmediums nach siebentägiger Kultivierung im Bioreaktorsystem und Kontrollen. Die Graphik stellt das relative Fluoreszenzsignal im ROX-Kanal (rot) und im FAM-Kanal (grün) dar. Die interne Kontrolle des qPCR-Kits zeigt ein steigendes, relatives Fluoreszenzsignal im ROX-Kanal an. Ein verstärkt ansteigendes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal, welches auf eine bakterielle Kontamination hindeutet, kann nur für die Positivkontrolle gemessen werden.

8.2 Materialien, Geräte und Software

Im folgenden Abschnitt werden alle während der Durchführung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendeten Materialien, Geräte und Programme aufgelistet.

8.2.1 Geräte

In diesem Abschnitt werden alle während der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet.

Gerät	Hersteller
μCT XT H 160	Nikon Metrology NV, Tring, UK
3D-Drucker BIO X	Cellink, Göteborg, Schweden
3D-Drucker Makerbot Mini	Makerbot, New York, USA
Autoklav DX-150	Systec GmbH, Linden
Autoklav DX-65	Systec GmbH, Linden
Autoklav VX-150	Systec GmbH, Linden
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Fluoreszenzlampe pE-300	CoolLED, Andover, UK
Flusssensor Sonoflow	Sonotec GmbH, Halle (Saale)
Geldokumentation Fast Gene FAS V	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren
Gelelektrophorese Rotiphorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator ICOver	Memmert, Schwabach
Kreiselwippe Mini Gyro-rocker SSM3	Cole-Parmer GmbH, Staffordshire, UK
Labornetzteil HMP4040	Rohde & Schwarz, München
Magnetrührer Cimarec-i Mono	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskop CKX 53	Olympus K.K., Shinjuku, Japan
Mikroskop IX 83	Olympus K.K., Shinjuku, Japan
Mikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom 2040 AutoCut	Reichert-Jung (Leica Microsystems, Wetzlar)
Nanoindenter Pavone	Optics11Life, Amsterdam, NL
Orbitalschüttler Rotanax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Peristaltikpumpe Pumpdrive 5206	Heidolph Instruments, Schwabach
Peristaltikpumpe Reglo ICC 4-Kanal	Cole-Parmer GmbH, Staffordshire, UK
pH-Meter HI221 Microprocessor ph-Meter	HANNA instruments, Woonsocket, USA

Precision pressure control system P ² CS	Biophysical Tools GmbH, Leipzig
Prüfmaschine Instron 5565A	Instron, Norwood, USA
Reinstwasser-Anlage Q-Pod	Merck KGaA, Darmstadt
Rheometer MCR302	Anton Paar GmbH, Graz, AUT
RT-PCR CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Spectrophotometer Spectramax i3x	Molecular Devices LLC, San Jose, USA
Spülmaschine Miele Professional G7883 CD	Miele, Gütersloh
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermoschüttler Thermal Shake lite	VWR International LLC, Radnor, USA
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Vortexer Advanced IR Vortex Mixer	Velp Scientifica, Ismate, Italien
Waage Entris224I-1S	Sartorius AG, Göttingen
Waage Scout Pro 200g	OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Swi
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Megafuge 8 Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR International LLC, Radnor, USA

8.2.2 Software

In diesem Abschnitt werden alle für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Programme aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Software.

Anwendung	Software	Hersteller
μCT-Analyse	VG Studio Max 2.2	Volume Graphics GmbH, Heidelberg
Bildaufnahme	ProgressGryphax	Jenoptik
Bildaufnahme	Cellsens	Olympus
Bildverarbeitung	CorelDRAW X7	CorelDRAW®, Ottawa, Kanada
Bildverarbeitung	ImageJ	-
Bildverarbeitung	GraphicAnalyzer	TCI (Patrick Lindner)
Bildverarbeitung	OlyVIA	Olympus K.K., Shinjuku, Japan
CAD-Design 2020	Autodesk AutoCAD	Autodesk, San Rafael, USA
CFD-Simulation	Comsol Multiphysics 5.2	Comsol Multiphysics GmbH, Göttingen
CTB-Auswertung	SoftMax Pro 7.0.2	Molecular Devices LLC, San Jose, USA
Datenanalyse	MS Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Datenanalyse	MS Excel XLSTAT 2020	Addinsoft Inc, New York, USA
Datenanalyse	Origin	OriginLab, Northampton, USA
FIA-Steuerung	FIA-Master	TCI (Patrick Lindner)
Literaturverwaltung	Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
Materialtestung	Bluehill	Illinois Tool Works Inc, USA
Netzwerkanalyse	AngioTool	Zudaire et al. 2011 (Zudaire et al. 2011)

qPCR-Analyse	CFX-Maestro	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Viskositätsmessung	Rheoplus	Anton Paar GmbH, Graz, AUT

8.2.3 Verwendete Chemikalien und Kits

Im folgenden Abschnitt werden alle verwendeten Chemikalien und Kits aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
1,1,1,6,6,6-Hexafluoro-2-propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calcein-AM	Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dextran, Texas Red™, 10,000 MW, Lysine Fixable	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPX	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin G (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99% vergällt mit MEK	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
FKS	Capricorn Scientific GmbH, Erbsdorfergrund
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Gentamycin	Biochrome, Berlin
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Merck KGaA, Darmstadt
Histoplast LP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Humanserum	c.c. pro GmbH, Oberdorla
Hydrocortison	Merck KGaA, Darmstadt

Isopropanol 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methylcellulose	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NaCl Cellpure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat -Lösung (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Fisher Scientific, Schwerte, Germany
Resomer X (Polydioxanon)	Evonik Industries, Essen
ROTI LOAD 1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ROTI LOAD 2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Blue	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Mark Tricolor Proteinmarker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ROTIPHORESE Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS Pufferan $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS/HCl $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan Blau	VWR International GmbH, Darmstadt
TWEEN 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Uracil	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	J.T. Baker, Avantor, Radnor, USA

Tabelle 7: Verwendete Analyse-Kits.

Anwendung	Kit	Hersteller
CTB-Assay	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
HRP-Nachweiß	Pierce DAB Substrate Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinquantifizierung	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinquantifizierung	Pierce Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilitätstest	Microsart® Bacteria Extraction	Minerva Biolabs GmbH, Berlin

8.2.4 Puffer

In diesem Abschnitt werden alle verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung gelistet.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Bjerrum-Puffer	48 mM TRIS, 39 mM Glycin, 20% Methanol, pH 9,2
PBS	1 Tablette auf 500 mL
SDS-Laufpuffer (1x TGS)	25 mM TRIS, 1,92 M Glycin, 0,1% SDS
TRIS/HCl-Puffer (pH 8,8)	1,5 M TRIS/HCl
TRIS/HCl-Puffer (pH 6,3)	1,5 M TRIS/HCl

8.2.5 Verbrauchsmaterialien

In diesem Abschnitt werden alle verwendeten Verbrauchsmaterialien gelistet.

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
3-Stopper-Schlauch (1,14 m)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CryoPure-Gefäße 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Dialysemembran Spectra/Por® Biotech CE MWCO 100 000, 16 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Gewebekulturplatten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mediumfilter: Sartolab P20 plus	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Nahtmaterial Prolene monofil 5-0	Ethicon Inc., Raritan, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Platten	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Pipettenspitzen (10 µl, 20-200 µl, 1000 µl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schlauchverbinder	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Silikonschläuche	Kartell, Noviglio, It
Sterilfilter 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Stripette Pipette (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Stripette Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., New York, USA
Transfermembran Roti PVDF	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning Inc., NY, USA

8.2.6 Antikörper, Proteine und Farbstoffe

In diesem Abschnitt werden alle verwendeten Antikörper, Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe gelistet.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Proteine und Farbstoffe.

Antikörper & Proteine	Hersteller
Anti-Fibrinogen alpha chain antibody [ab92572]	Abcam, Cambridge, UK
Anti-VE Cadherin antibody [ab205336]	Abcam, Cambridge, UK
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt
Fibrinogen from human plasma 50-70% [F3879]	Merck KGaA, Darmstadt
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) [ab97051]	Abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 [ab150077]	Abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 555 [ab150078]	Abcam, Cambridge, UK

Hoechst 33342	Fisher Scientific, Schwerte, Germany
Phalloidin-iFluor 555 Reagent [ab176756]	Abcam, Cambridge, UK
Recombinant Human FGF-basic (154 a.a.) [100-18B]	Peptrotech, Hamburg
Recombinant human VEGF 165A protein (Active) [ab9571]	Abcam, Cambridge, UK
Thrombin	Merck KGaA, Darmstadt

8.2.7 Zellsysteme und Zellkulturmedium

In diesem Abschnitt werden alle verwendeten Zellsysteme und Zellkulturmedien gelistet.

Tabelle 11: Verwendete Zellsysteme.

Zellsystem	Hersteller
GFP-HUVECs	Caltag Medsystems Ltd, Buckingham, UK
AD-hMSCs AD47N	TCI, Leibniz Universität Hannover

Tabelle 12: Verwendete Zellkulturmedien.

Zellkulturmedium	Hersteller
EGM-2	PromoCell, Heidelberg
a-MEM	Fisher Scientific, Schwerte, Germany

8.3 Methoden

8.3.1 Scaffold-Herstellung und Analyse

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden zur Herstellung und Analyse der *Scaffolds* genutzten Methoden dargestellt.

8.3.1.1 PDO-Scaffold-Herstellung

Scaffolds bilden das dreidimensionale Grundgerüst für Zellen im *Tissue Engineering*. Die in dieser Arbeit analysierten *Scaffolds* werden mit zwei unterschiedlichen Methoden hergestellt. Einerseits mittels einer Salzlaugung und andererseits mittels 3D-Druck.

8.3.1.1.1 Herstellung von porösen PDO-Scaffolds mittels Salzlaugung

Für die Herstellung der porösen *Scaffolds* werden Pellets aus Poly-1,4-dioxan-2-on (Resomer X; PDO) in 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol zu einer resultierenden Konzentration von 0,05 g/mL gelöst. Das Gemisch wird in einem verschlossenen Glasgefäß bis zum vollständigen Lösen des Polymers gelagert, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu verhindern. Damit der Lösungsprozess beschleunigt wird, wird die Lösung in regelmäßigen Abständen gerührt, um eine homogene Mischung zu erhalten. Parallel werden 0,4 g NaCl in einem PTFE-Gefäß mit einem inneren Durchmesser von 17 mm abgewogen. In jedes Gefäß werden 0,24 mL der PDO-Lösung pipettiert. Anschließend werden die Gefäße verschlossen, um ein zu vorzeitiges Verdampfen des Lösungsmittels zu verhindern und somit eine gleichmäßige Verteilung der Lösung und der Salzkristalle am Gefäßboden zu ermöglichen. Nach einer Stunde Inkubationszeit werden die Gefäße geöffnet, damit das Lösungsmittel über Nacht evaporieren kann (Abbildung 45A). Die Salz/PDO-Blöcke werden nach Verdampfen des Lösungsmittels zum Auslaugen des Salzes für sechs Stunden in drei Liter deionisiertes Wasser überführt. Das Wasser wird dabei alle zwei Stunden gewechselt (Abbildung 45B). Abschließend werden die *Scaffolds* erst auf Filterpapier für eine Stunde getrocknet und dann bei - 80 °C über Nacht eingefroren und anschließend bei 0,1 mbar für 16 h lyophilisiert (Abbildung 45C). Mit einer Biopsie-Stanze werden kleine *Scaffolds* (6 mm Durchmesser) aus den porösen *Scaffold*-Blöcken ausgestanzt und bei - 20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Scaffold-Herstellung

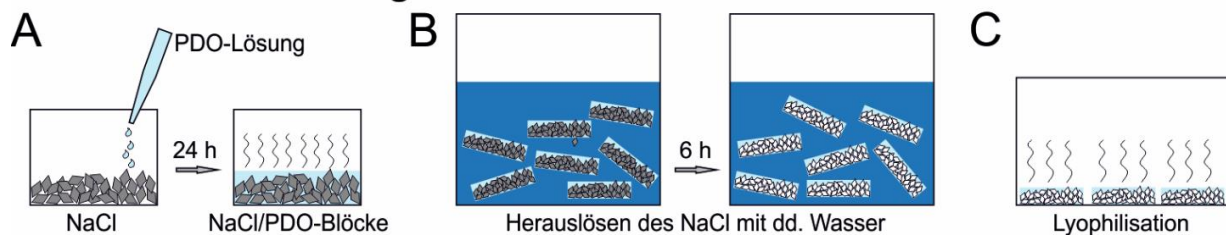


Abbildung 45: Ablauf der *Scaffold*-Herstellung für poröse PDO-Scaffolds durch Salzlaugung.

8.3.1.1.2 Herstellung von PDO-Scaffolds mittels 3D-Druck

Für die Herstellung 3D-gedruckter *Scaffolds* aus PDO mittels eines 3D-Druckers (Drucker BIO X von Cellink) werden die Pellets in einem Schmelzschichtungsverfahren (engl.: *Fused Deposition Modeling* (FDM)) verarbeitet. Hierfür werden zuerst die Pellets in die Kartusche des Filament-Druckkopfes gefüllt. Die Kartusche wird in den 3D-Drucker eingesetzt und vor dem Druckprozess auf eine Temperatur von 125 °C vorgeheizt. Das Druckbett des BIO X wird ebenfalls auf eine Temperatur von 60 °C vortemperiert. Sobald die Temperaturen erreicht sind, wird der Druckprozess gestartet, um eine thermische Degradation des PDO durch zu langes Erhitzen zu vermeiden. Der Druck erfolgt mit einer Düse mit einem Durchmesser von 0,1 mm bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/s und einem Druck von 400 kPa. Als Schichthöhe wurde 0,1 mm eingestellt.

8.3.1.2 Fibrinogen-Aufreinigung aus humanem Blutplasma

Für die Beschichtung der PDO-Scaffolds wurde Fibrinogen verwendet. Als Alternative zu kommerziell erhältlichem Fibrinogen wurde es aus humanem Blutplasma isoliert und analysiert.

8.3.1.2.1 Fibrinogen-Aufreinigung

Als Vergleich zu kommerziell erhältlichem, humanem Fibrinogen, wird Fibrinogen aus humanen Blutplasma-Spenden (bereitgestellt vom Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover) aufgereinigt. Das tiefgefrorene Plasma wird zuerst im Kühlschrank aufgetaut, á 45 mL in 50 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und erneut für 24 h bei -20 °C eingefroren. Danach wird das Plasma für 24 h bei -80 °C eingefroren. Anschließend werden die Proben zum langsamen Auftauen 20 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, dabei fällt das Fibrinogen aus. Zur Extraktion des Präzipitats werden die Reaktionsgefäße für 40 min bei 3000 xg und 4 °C zentrifugiert und der flüssige Plasmaüberstand anschließend abgenommen. Die resultierenden Pellets des Präzipitats werden zweimal mit sterilem dd. Wasser und durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 xg und 4 °C gewaschen. Die gewaschenen Pellets werden langsam auf RT erwärmt und in 100 µL gesammeltem, initial abgenommen Plasmaüberstand

gelöst und für 15 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Proben kurz gevortext und erneut für 10 min im Brutschrank inkubiert.

Zum entfernen kleinerer Proteine wird nach der Extraktion eine Dialyse mit einer Membrandurchlässigkeit für Proteine kleiner 100.000 Da durchgeführt. Hierfür wird das Präzipitat in den Dialyseschlauch gefüllt und gegen PBS für 24 h unter konstantem Rühren in einem 1 L-Gefäß dialysiert. Das resultierende Proteinpräzipitat wird bei -20 °C tiefgefroren und bis zur Verwendung gelagert.

8.3.1.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Micro BCA-Assay

Die Gesamtproteinkonzentration des Proteinpräzipitats aus der Fibrinogen-Aufreinigung wird mittels Micro BCA-Assay, entsprechend des Hersteller-Protokolls, bestimmt. Zuerst wird eine Verdünnungsreihe mit BSA in einer Konzentration zwischen 200 µg/mL bis 0,5 µg/mL hergestellt und die Proben ebenfalls bis zu 1:4000 verdünnt, um sicher eine Verdünnungsstufe innerhalb der Kalibrationsreihe zu erreichen. Dann wird die Arbeitslösung aus den Micro BCA-Lösungen A, B und C hergestellt im Verhältnis 25:24:1 (A:B:C). Auf einer 96-Well-Platte werden je Well 150 µL Probe und 150 µL Arbeitslösung aufgetragen. Alle Proben werden in Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Platte wird nach dem Auftragen der Proben verschlossen und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm mit einem Plattenlesegerät ausgewertet. Anhand einer Kalibrationsgerade, welche auf Basis der BSA-Verdünnungsreihe erstellt werden kann, wird die Konzentration der Probe bestimmt.

8.3.1.2.3 Fibrinogen-Konzentrationsbestimmung nach Clauss

Der Fibrinogen-Anteil im aufgereinigten Proteinpräzipitat kann durch das Zentrallabor der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) mit der Methode nach Clauss bestimmt werden. Die Methode beruht darauf, dass die Gerinnungszeit von Fibrinogen nach Zugabe von Thrombin proportional zur Konzentration des Fibrinogens ist. Es werden Proben aus drei Aufreinigungen jeweils dreifach untersucht. Diese werden vor der Analyse 1:20, und 1:50 mit PBS verdünnt, um den erforderlichen Messbereich zu erreichen.

8.3.1.2.4 SDS-PAGE und Western-Blot

Zur Analyse der Bestandteile des Proteinpräzipitats wird eine SDS-PAGE, gefolgt von einem Western Blot zur Identifizierung der Fibrinogen- α -Kette durchgeführt. Für zwei 10%ige Gele werden 15 mL Lösung für die Trenngele hergestellt. Diese Lösung besteht aus 3,75 mL 40%iger Polyacrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 1,5 mL 1%iger SDS-Lösung, 4,2 mL 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8), 5,55 mL dd. Wasser, 30 µL TEMED und 75 µL APS. Die

resultierende Lösung wird nach Zugabe von APS und TEMED zügig verarbeitet. Für die Sammelgele (6%tig) werden 5 mL Lösung aus 750 μ L 40%iger Polyacrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 500 μ L 1%iger SDS-Lösung, 630 μ L 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8), 3,12 mL dd. Wasser, 10 μ L TEMED und 25 μ L APS zusammen pipettiert. Die Proben werden 4:1 mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Probenpuffer vermischt, 5 min bei 90 °C inkubiert und nach vollständiger Aushärtung der Gele zusammen mit einem Proteinmarker (ROTI®Mark TRICOLOR) auf beide Gele aufgetragen. Als Laufpuffer wird 1x TGS-Puffer (pH 8,3 mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS) verwendet. Die SDS-PAGE wird mit einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt, bis die Banden des Markers am unteren Ende der Gele zu erkennen sind.

Die resultierenden Gele werden entweder mit einer kolloidalen Coomassie-Färbung gefärbt, um alle aufgetrennten Proteine im Präzipitat zu visualisieren, oder mittels Western Blot, zum spezifischen Nachweis von Fibrinogen, weiter analysiert.

Zur Coomassie-Färbung wird das Gel zuerst für 1 h in Fixierlösung (79% Wasser, 1% o-Phosphorsäure und 20% Methanol) und anschließend 15 h in der Roti-Blue Färbelösung (60% Wasser, 20% Methanol und 20% Roti-Blue (5x konzentriert)) inkubiert. Zum Abschluss wird überschüssige Farbe durch Inkubation des Gels in der Waschlösung (75% Wasser und 25% Methanol) entfernt und das Gel per FastGene® FAS-V Geldokumentationssystem mittels Bildaufnahme dokumentiert.

Für den Western Blot wird das Gel zusammen mit einer Blotting-Membran und Blotpapier in die Blotting-Vorrichtung eingespannt. Hierbei wird folgende Reihenfolge verwendet: Kathodenseite der Kompressionskassette, Matte, Blotpapier, Gel, Membran, Blotpapier, Matte, Anodenseite der Kompressionsmembran. Die Membran wurde zuvor 15 s in Methanol getaucht, anschließend 2 min in dd. H₂O und zuletzt 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Blotpapiere und die Matten werden vor dem Zusammenbau ebenfalls kurz in Transferpuffer getränkt. Als Transferpuffer wird Bjerrum-Puffer (pH 9,2) verwendet. Der Puffer enthält 48 mM Tris, 39 mM Glycin und 20% Methanol. Der Blot wird mit einer Spannung von 25 V bei einer Stromstärke von 1000 mA für 60 min durchgeführt. Nach Durchführung des Blots wird die Membran über Nacht im Kühlschrank mit *Blocking*-Lösung (5% Magermilchpulver in PBST) inkubiert, um die Bindestellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Die Identifizierung des Fibrinogens erfolgt durch einen Kaninchen Anti-Fibrinogen- α -Ketten-Antikörper 1:6000 in PBST für eine Stunde unter leichtem Schütteln. Danach wird die Membran erneut dreimal mit PBST gewaschen, um Reste

des Primärantikörpers zu entfernen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem Ziegen-Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper, 1:6000 in PBST für eine Stunde inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal mit PBST gewaschen. Zur kolorimetrischen Identifikation wird die Membran mit 25 mL einer Diaminobenzidin-Lösung (DAB) (22,5 mL Peroxid-Lösung und 2,5 mL DAB-Lösung) für 15 min inkubiert.

8.3.1.3 Scaffold-Analyse

In den folgenden Abschnitten sind alle Methoden dargestellt, welche für die Analyse der *Scaffolds* eingesetzt wurden.

8.3.1.3.1 Biokompatibilitätsanalyse mittels CTB-Assay

Für die Bestimmung der Biokompatibilität der hergestellten *Scaffolds* wird ein Extrakt der *Scaffolds* mit einem CellTiter-Blue Assay (CTB-Assay) untersucht. Der CTB-Assay beruht auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin, wodurch auf die metabolische Aktivität der Zellen geschlossen werden kann. Untersucht werden sowohl die mittels 3D-Druck hergestellten *Scaffolds*, als auch die durch Salzlaugung hergestellten *Scaffolds*.

Die PDO-*Scaffold* werden zunächst in Zellkulturmedium (EGM-2) bei 37 °C nach DIN EN ISO 10993 inkubiert. Die porösen *Scaffolds*, welche mittels Salzlaugung hergestellt werden, werden in einer Konzentration von 50 mg/mL für 72 h inkubiert. Aus dem gewonnenen Extrakt wird eine Verdünnungsreihe mit Konzentration zwischen 50 mg/mL bis 6,25 mg/mL hergestellt. Für den Test der mittels 3D-Druck hergestellten *Scaffolds*, wird das PDO-Filament in einer Konzentration von 0,2 g/mL für 120 h inkubiert. Für die Biokompatibilitätstestung werden HUVECs in EGM-2 mit einer Zelldichte von 8000 Zellen/cm² in einer 96-Well-Platte ausgesiedelt. Das erfolgreiche Anwachsen der Zellen wird mittels Phasenkontrastmikroskopie nach 24 h verifiziert, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet wird. Für den Test wird das Zellkulturmedium abgesaugt und für 24 h mit je 100 µL des PDO-Extraktes und dessen Verdünnungen ersetzt. Zellkulturmedium (EGM-2) dient als Negativ-Kontrolle. Alle Proben werden 4-fach aufgetragen. Nach 24 h Inkubation wird der PDO-Extrakt von den Zellen vorsichtig abgesaugt und je 100 µL CTB-Medium aufgetragen (Basalmedium mit 10% CTB-Reagenz). Die Bildung von Resorufin wird nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C photometrisch bei einer Wellenlänge von 544 nm bestimmt und die Aktivität im Vergleich zur Negativprobe bestimmt.

8.3.1.3.2 Strukturanalyse der porösen PDO-Scaffolds

Sowohl die Oberflächenstruktur, als auch die innere Struktur der hergestellten *Scaffolds* wird mit verschiedenen Methoden untersucht. Zusätzlich werden die mechanischen Eigenschaften der *Scaffolds* analysiert.

8.3.1.3.2.1 Optische Analyse der porösen PDO-Scaffold-Oberfläche

Die Porenstruktur der *Scaffolds* wird optisch unter Verwendung von Phasenkontrast-Mikroskopie untersucht. Anhand der Bilder kann der Durchmesser, der an der Oberfläche sichtbaren Poren der *Scaffolds*, bestimmt werden. Hierfür wurden je drei Aufnahmen von drei *Scaffolds* mit der Software Cellsens von Olympus analysiert.

8.3.1.3.2.2 μ CT-Untersuchung

Die Mikrostruktur der *Scaffolds* wird mittels Micro-CT (μ CT) untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit dem XT H 160 von Nikon Metrology mit einer maximalen Beschleunigungsspannung von 160 kV. Das poröse PDO-Scaffold wird zur Analyse auf dem Probenhalter platziert (**Abbildung 46**). Für den Scan werden folgende Parameter verwendet: Eine Strahlenergie von 75 kV, ein Strahlstrom von 75 μ A mit einer Leistung von 5,6 W und einer Belichtungszeit von 708 ms. Mit diesen Einstellungen kann eine Auflösung von 14 μ m erreicht werden. Die Auswertung der Dicke der Wände zwischen den Poren wird auf Basis der aufgenommenen Bilder mit ImageJ durchgeführt. Für die Auswertung der Porosität wird ein Volumen von 247,97 mm³ ausgewertet. Die Analyse beruht auf den unterschiedlichen Grauwerten zwischen *Scaffold* und Pore auf den aufgenommenen Bildern. Die Auswertung der 3D-Struktur wird mit der Software VG Studio Max 2.2 durchgeführt.



Abbildung 46: Poröses PDO-Scaffold für μ CT-Analyse auf Probenhalter. Zur Analyse mittels μ CT wurde ein *Scaffold* mit einem Durchmesser von 17 mm auf dem Probenhalter platziert.

8.3.1.3.3 Mikromechanische Analyse der porösen PDO-Scaffolds

Die mikromechanischen Eigenschaften der porösen PDO-Scaffolds werden mit der mechanobiologischen Plattform Pavone durchgeführt. Vier verschiedene Proben werden dabei miteinander verglichen: Ein frisches PDO-Scaffold in PBS, ein frisch mit Fibrin beschichtetes Scaffold (siehe Abschnitt *Scaffold-Besiedelung*) und zwei mit Zellen besiedelte Scaffolds, eines ist für einen Tag kultiviert und eines für vier Wochen zuvor kultiviert worden (siehe Abschnitt *Scaffold-Besiedelung*). Alle Scaffolds wurden bis zur Analyse in PBS gelagert. Die Proben werden an verschiedenen Stellen der Scaffold-Oberfläche mit einem Abstand von 100 μm analysiert. Die Analyse wird mit einer Sonde mit einer kugelförmigen Spitze mit einem Radius von 260 μm durchgeführt (Steifheit des Auslegers: 0,25 N/m). Die Eindringtiefe der Sonde ist ca. 10 μm . Je Scaffold werden mindestens elf Messungen durchgeführt. Aus den resultierenden Last/Eindring-Kurven kann mit dem Hertzschen Kontaktmodell das effektive Youngsche Modul berechnet werden.

8.3.1.3.4 Zugversuche

Die Materialeigenschaften poröser und 3D-gedruckter PDO-Scaffolds werden mit einem elektromechanischen Messsystem (Instron 5565A) untersucht. Nach der DIN-Norm 527-2 werden Testkörper des Typs 1BA und 1BB durch 3D-Druck oder einem Gussverfahren mit entsprechender Form erstellt (Abbildung 47). Zur Messung werden die äußeren Stege der Messkörper in den Halterungen des Messsystems fixiert. Die Messung erfolgt bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/min mit welcher die porösen Testkörper auseinandergezogen werden, bzw. bei 10 mm/min für die 3D-gedruckten Testkörper. Aus den gemessenen Zug/Last-Kurven kann das Youngsche Modul, die Länge des Scaffolds beim Bruch und die maximale Zugfestigkeit berechnet werden. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

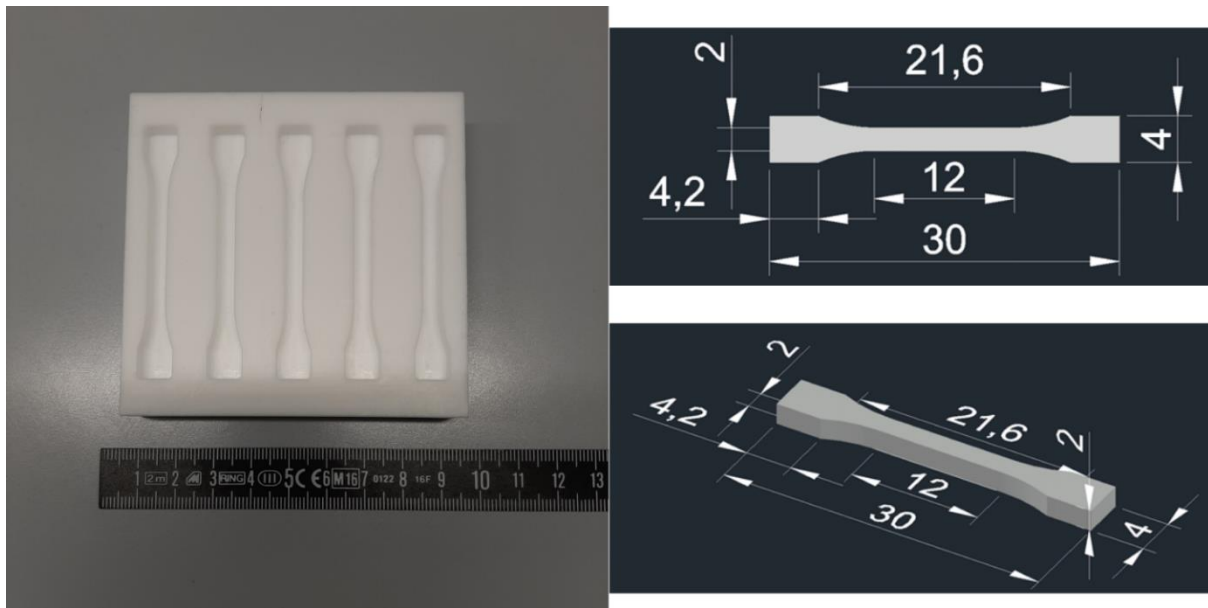


Abbildung 47: Gußform (links) und 3D-Modell für Probekörper. Die Probekörper für die porösen PDO-*Scaffolds* werden mit einer Gußform nach Typ 1BA hergestellt (links). Die Probekörper für den 3D-Druck werden anhand eines 3D-Modells nach Typ 1BB hergestellt (rechts, Maßangaben in mm).

8.3.1.3.5 Bestimmung der Degradation durch Messung der Gewichtsabnahme

Die Degradation der porösen PDO-*Scaffolds* soll nach Inkubation in PBS untersucht werden. Die lyophilisierten *Scaffolds* (2x1 cm) werden zu Beginn des Versuches gewogen und anschließend mittels UV-Licht (2x 30 min) sterilisiert. Die gewogenen *Scaffolds* werden anschließend in 4 ml PBS (+0,5% Gentamycin) bei 37 °C für mehrere Wochen inkubiert. Das PBS (+0,5% Gentamycin) wird dabei alle vier Tage gewechselt. Nach sieben Tagen (wiederholend) werden drei *Scaffolds* entnommen, mit dd. Wasser dreimal für ein paar Sekunden gewaschen und bei 55 °C über Nacht getrocknet. Anschließend werden die *Scaffolds* erneut gewogen und die prozentuale Gewichtsabnahme bestimmt.

8.3.1.3.6 Analyse der thermischen Degradation des PDO

Für die Analyse der thermischen Degradation wird PDO in der Kartusche des BIO X für 120 min auf 130 °C erhitzt. Nach je 30 min werden Test-*Scaffolds* mit einem Auffüllgrad von 25%, einer 0,15 mm Düse, einer Druckbettemperatur von 60 °C, einem Druck von 500 kPa, einer Druckkopfgeschwindigkeit von 1,3 mm/s und einer Schichthöhe von 0,14 mm gedruckt.

8.3.2 Zellkultur

In diesem Abschnitt werden alle in der Zellkultur und bei der Besiedelung der *Scaffolds* verwendeten Methoden dargestellt.

8.3.2.1 Grundlagen der Zellkulturtechnik

8.3.2.1.1 Revitalisierung von Primärzellen

Alle verwendeten Zellen (AD-hMSCs, HUVECs und GFP-HUVECs) werden vor der Verwendung in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen gelagert. Für die Revitalisierung werden diese dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wird zügig in eine bereits mit vorgewärmten (37 °C) Zellkulturmedium (10 mL in T75-Flaschen, bzw. 24 mL in T175-Flasche) befüllte Zellkulturflasche überführt. Eine homogene Verteilung der Zellen in der Zellkulturflasche wird durch leichtes Schwenken der Flasche erreicht. Die Zellen werden bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert. Nach einem Tag wird das Zellkulturmedium initial gewechselt. Dafür wird das alte Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch eine identische Menge an frischem Zellkulturmedium ersetzt. Die AD-hMSCs werden in *α-Minimum Essential Medium* (αMEM) mit 10% Humanserum (HS) und 0,5% Gentamycin kultiviert. Die HUVECs werden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (EGM-2) mit zugehörigem *Supplement-Mix* sowie zusätzlichen 8% fetalem Kälberserum (FKS) und 0,5% Gentamycin kultiviert.

8.3.2.1.2 Kultivierung und Passage von Primärzellen

Während der Kultivierung in den Zellkulturflaschen wird das Zellkulturmedium bis zum Erreichen einer 80%igen - 90%igen Konfluenz der Zellen alle drei bis vier Tage gewechselt (siehe Abschnitt *Revitalisierung von Primärzellen*). Ab dieser Konfluenz müssen die Zellen passagiert werden, um eine höhere Konfluenz zu vermeiden, da diese die Proliferationsgeschwindigkeit hemmt und die Passage erschwert. Für die Passage wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen auf der Wachstumsfläche der Zellkulturflaschen vorsichtig mit 10 mL vorgewärmten PBS (37 °C) gewaschen, um lösliche Proteine auf der Zelloberfläche zu entfernen und die Effektivität der nachfolgend eingesetzten Accutase zu verbessern. Das PBS wird anschließend ebenfalls vorsichtig abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen werden 3 mL (bei einer T75-Flasche), bzw. 4 mL (bei einer T175-Flasche) Accutase auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt, bei 37 °C für mindestens 5 min inkubiert, bis sich alle Zellen von der Oberfläche abgelöst haben. Dieser Prozess wird durch leichtes Rütteln der T-Flasche unterstützt. Nach spätestens 10 min wird die Reaktion der Accutase durch Zugabe der gleichen Menge an frischem Zellkulturmedium gestoppt, um eine Schädigung der Zellen durch Hydrolyse von Proteinen der Zellmembran durch die Accutase zu verhindern. Durch leichtes auf und ab Pipettieren werden die Zellen vereinzelt und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wird für 5 min bei 300 xg und RT zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Zellkulturüberstandes in

frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Eine 20 µl Probe der Zellsuspension wird zur Zellzahlbestimmung mittels *improved* Neubauerzählkammer 1:2 mit Trypanblau vermischt, um den Anteil toter (werden durch Trypanblau gefärbt) und lebender Zellen zu bestimmen. Für alle Versuche werden Zellen der Passage 4-6 verwendet.

8.3.2.1.3 Kryokonservierung von Primärzellen

Für die Kryokonservierung der Zellen werden diese mit Kryomedium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Kryomedium setzt sich aus 70% Basalmedium, 20% Serum (HS für AD-hMSCs und FKS für HUVECs) und 10% DMSO zusammen. Nach Bestimmung der Zellzahl wird die Zell-Suspension bei 300 xg für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit gekühltem Kryomedium in einer Konzentration von $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter resuspendiert. Die Suspension wird in Kryoröhrchen á 1 mL aliquotiert und in einem Kryo-Container (Mr. Frosty) bei -80 °C für 24 h eingefroren. Anschließend werden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

8.3.2.2 Herstellung von konditioniertem Zellkulturmedium

Für die Herstellung von mit Wachstumsfaktoren angereichertem Zellkulturmedium werden AD-hMSCs in α MEM (AD47N) unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen für 14 Tage kultiviert.

Die AD-hMSCs werden mit einer Dichte von 3000 Zellen/cm² in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesiedelt und für drei Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Anschließend werden die Zellen für weitere 14 Tage unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen bei 37 °C, 5% CO₂ und 2,5% O₂ auf einem Orbitalschüttler mit einer Auslenkung von 20 mm bei 175 rpm weiter kultiviert. Unter diesen Bedingungen erfahren die Zellen eine Scherspannung von ~ 7-14,7 dyn/cm². Die Scherspannung wurde nach Dardik *et al.* berechnet (Dardik et al. 2005).

$$\tau = (r * \sqrt{\eta * \rho * (2 * \pi * rpm)^3}) / 100 \quad (1)$$

Hierbei ist τ die Scherspannung (Scherstress), r der Radius in mm, η die Dichte der Flüssigkeit und ρ die dynamische Viskosität. Nach 14 Tagen Kultivierung wird das Zellkulturmedium abgenommen, in 50 mL-Reaktionsgefäßen pipettiert und eventuelle Zellreste werden durch Zentrifugation bei 300 xg entfernt. Der Überstand wird in 50 mL-Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

8.3.3 Besiedelung der porösen PDO-Scaffolds und Auswertung der gebildeten Netzwerkstrukturen

8.3.3.1 Scaffold-Besiedelung

Die PDO-Scaffolds werden für die Vaskularisierung mit GFP-HUVECs und AD-hMSCs besiedelt. Die porösen PDO-Scaffolds werden vor Verwendung durch Bestrahlung mit UV-Licht für zweimal 30 min sterilisiert. Zur Besiedelung werden die Scaffolds zuerst mit 10 μ L einer Fibrinogen-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/mL Fibrinogen in PBS beschichtet. Anschließend werden 10 μ L einer dem Versuch entsprechenden Zellsuspension (siehe Tabelle 13-Tabelle 14) mit Thrombin mit einer Aktivität von 2,5 U/mL in PBS auf das Scaffold pipettiert (Abbildung 48). Die besiedelten Scaffolds werden für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die besiedelten Scaffolds in eine frische 24-Wellplatte für Suspensionskulturen überführt, um ein Auswachsen der Zellen vom Scaffold auf die Plattenoberfläche zu vermeiden, und 1 mL frisches Zellkulturmedium (für Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.3.3.2-8.3.3.5) hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂.

Nach abgeschlossener Kultivierung werden die Zellen auf den Scaffolds durch Inkubation des Gefäßes in 4% PFA-Lösung für 30 min fixiert. Die Auswertung der Zellstrukturen auf den Scaffolds erfolgt durch Fluoreszenzfärbung. Je nach Versuch werden Zellkerne, Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakte angefärbt (siehe Abschnitt *Fluoreszenzfärbungen*).

Scaffold-Besiedelung

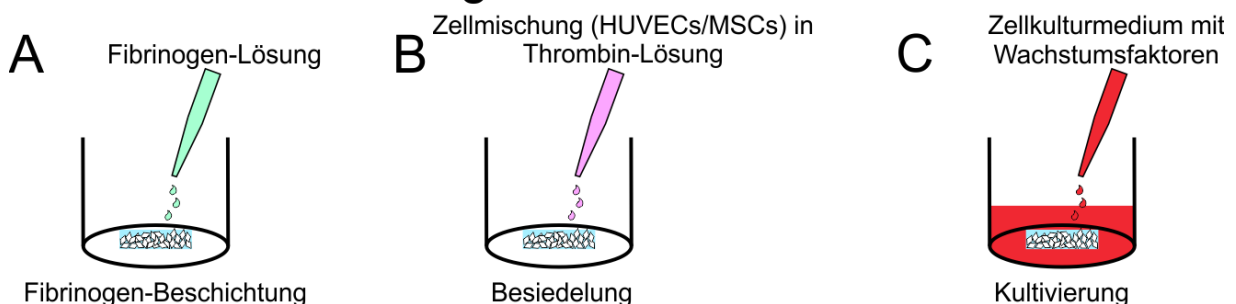


Abbildung 48: Ablauf der Scaffold-Besiedelung.

8.3.3.2 Erste Optimierung: Auswirkungen des Zellzahlverhältnisses

Zur Optimierung des Zellzahlverhältnisses werden HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 5:1, 2:3 und 1:5 angesiedelt und für 14 Tage bei 37 C°, 21% O₂ und CO₂ kultiviert. Als Zellkulturmedium wird eine Mischung aus 50% konditioniertem α MEM und 50% frischem, basalem α MEM verwendet. Die entsprechenden Zellzahlen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Untersuchte Zellzahlverhältnisses aus MSCs und GFP-HUVECs für Scaffold-Besiedelung.

Verhältnis	HUVECs	AD-hMSCs
5:1	250.000	50.000
2:3	100.000	150.000
1:5	50.000	250.000

8.3.3.3 Zweite Optimierung: Auswirkungen der Gesamtzellzahl und des verwendeten Zellkulturmediums

Für eine optimale Netzwerkbildung der Endothelzellen, werden verschiedene Kombinationen aus AD-hMSCs und GFP-HUVECs bei der Besiedelung der *Scaffolds* untersucht. Verglichen werden Zellzahl-Verhältnisse von 5:1 und 3:2 mit einer unterschiedlichen Gesamtzellzahl. Die untersuchten Kombinationen sind in Tabelle 14 dargestellt. Zusätzlich wurden diese Zellzahlkombinationen mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien getestet. Das erste Zellkulturmedium besteht aus konditioniertem α MEM und basalem α MEM in einem Verhältnis von 1:1 (Medium A), das zweite aus konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 (Medium B) in einem Verhältnis von 1:1.

Tabelle 14: Untersuchte Gesamtzellzahl-Kombinationen aus MSCs und GFP-HUVECs für Scaffold-Besiedelung.

Verhältnis	HUVECs	AD-hMSCs
2:3	100.000	150.000
2:3	200.000	300.000

Die kultivierten *Scaffolds* werden an Tag 4, 7 und 14 hinsichtlich der gebildeten Netzwerke mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂.

8.3.3.4 Dritte Optimierung: Verbesserung der Medienzusammensetzung

In dieser Versuchsreihe werden die *Scaffolds* mit einer Gesamtzellzahl von 250.000 Zellen im Verhältnis 2:3 (100.000 GFP-HUVECs/150.000 MSCs) besiedelt. Als Zellkulturmedium wird einer 1:1 Mischung konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 zusätzlich 2% frisches FKS zugesetzt. Als Vergleich werden zusätzlich besiedelte *Scaffolds* mit voll supplementiertem EGM-2 und frischem α MEM, ebenfalls im Verhältnis 1:1 kultiviert.

8.3.3.5 Optimierung der Medienzusammensetzung für

Vaskularisierungsversuche auf besiedelten PDO-Scaffolds

Für die Optimierung der Netzwerkbildung von Endothelzellen auf makroporösen PDO-*Scaffolds* wird der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium genauer analysiert. Die Zellen auf den *Scaffolds* (100.000 GFP-HUVECs/150.000 MSCs) werden hierfür mit verschiedenen Zellkulturmedien bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Alle Medien enthalten 48,75% basales EGM-2 Medium, 48,75% basales α MEM, 2% HS und 0,5% Gentamycin. Zusätzlich werden die Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Hydrocortison in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Der Anteil dieser Bestandteile ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Konzentration der zugesetzten Wachstumsfaktoren je verwendetem Zellkulturmedium.

Medium	VEGF	bFGF	Hydrocortison
Medium 1	10 ng/mL	10 ng/mL	0 ng/mL
Medium 2	10 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
Medium 3	20 ng/mL	20 ng/mL	0 ng/mL
Medium 4	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL

Alle Versuche werden in drei unabhängigen Kultivierungen mit drei *Scaffolds* je Medium durchgeführt.

8.3.3.6 Quantifizierung der Netzwerkstruktur auf den besiedelten PDO-Scaffolds

Die Analyse der Auswirkungen der verschiedenen Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Hydrocortison erfolgt durch Quantifizierung der Netzwerkstrukturen. Zu diesem Zweck werden die *Scaffolds* mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Es werden zu jedem untersuchten *Scaffold* Z-Stapel erstellt. Der Abstand der einzelnen Bilder beträgt 2 μ m über eine Gesamtdistanz von 200 μ m. Aus jedem Z-Stapel wird ein einzelnes Bild durch Z-Projektion erstellt. Diese Bilder werden mit der Software Graphic-Analyzer bearbeitet, um eine Maske zu erstellen, welche die Hintergrund-Fluoreszenz ausblendet. Folgende Parameter werden dafür verwendet: Closing 11, Threshold 38-70 je nach Fluoreszenzintensität. Anschließend werden die Masken auf die Z-Projektion gelegt und überprüft, ob die Maske alle

Bereiche korrekt erfasst. Sind Unregelmäßigkeiten aufgrund fließender Übergänge oder sehr schwacher Fluoreszenz zu erkennen, werden diese manuell angepasst.

Die Quantifizierung der Netzwerkstrukturen erfolgt mit der Software AngioTool. Hierbei werden folgende Parameter verwendet: Low Threshold 15, High Threshold 255, Vessel Thickness 5-24, Scaling Factor 1. Die Parameter müssen aufgrund einer starken Variation in der Netzwerkausdehnung (Gefäßdicke) teilweise individuell angepasst werden. Aus dem Ergebnis werden die Werte für die Gesamtnetzwerkfläche, die Gesamtlänge der Netzwerke und die Anzahl der Verzweigungen miteinander verglichen und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 8.3.3.7).

8.3.3.7 Statistische Analyse der Netzwerk-Quantifizierung

Für eine statische Auswertung der Auswirkung der verschiedenen Wachstumsfaktorkonzentrationen auf die Netzwerkbildung werden sechs Bilder aus den drei unabhängigen Kultivierungen je verwendetem Medium ausgewertet (siehe Abschnitt *Analyse der Scaffold-Besiedelungen und Quantifizierung der Netzwerkstruktur auf den besiedelten PDO-Scaffolds*). Die statistische Analyse wird mit dem Programm XL-Stat durchgeführt. Zuerst werden der Shapiro-Wilk-Test und der Levene-Test für die Analyse der Normalverteilung der Werte und der Varianzhomogenität durchgeführt. Im Anschluss wird eine ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test für einen paarweisen Vergleich mit $p = 0,05$ und $p = 0,01$ durchgeführt.

Zusätzlich wird ein paarweiser Vergleich der mit Medium 4 kultivierten *Scaffolds* durchgeführt, um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Verwendung von kommerziell erhältlichem Fibrinogen im Vergleich zu dem Fibrinogen aus Kryopräzipitation hat. Hierfür wird ein Mann-Whitney U-Test mit $p = 0,05$ und $p = 0,01$ durchgeführt.

8.3.3.8 Verifikation des Lumens innerhalb der gebildeten Netzwerkstrukturen

Für eine erfolgreiche Vaskularisierung eines *Scaffolds* ist es entscheidend, dass sich innerhalb der Netzwerkstrukturen ein Lumen nachweisen lässt. Der Nachweis des Lumens erfolgt durch Zugabe von 0,5 mg/mL Dextran (10 kDa), welches mit TexasRed, einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert ist, in das Zellkulturmedium an Tag 6 der Kultivierung. Nach weiteren 24 h werden die *Scaffolds* für 10 min mit PBS-Puffer gewaschen, anschließend mit 4% PFA für 30 min fixiert und noch einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Auswertung erfolgt mittels Konfokalmikroskopie bei einer Wellenlänge von 532 nm. Der rote Farbstoff sollte innerhalb der Netzwerkstrukturen erkennbar sein. Dies kann durch 3D-Projektion eines Z-Stapels gezeigt werden.

8.3.4 Kultivierung im Bioreaktorsystem

8.3.4.1 Neubesiedelung eines dezellularisierten Gefäßes eines Schweines im Bioreaktorsystem

Das dezellularisierte Schweine-Gefäß (*biotrics bioimplants* AG, Berlin) wird nach Fixierung mit sterilem Nahtmaterial in der zentralen Bioreaktorkammer (siehe Abschnitt: Verwendete Test-Gefäßstrukturen) im Bioreaktorsystem besiedelt. Die zentrale Bioreaktorkammer wird zu diesem Zweck auf einer Seite mittels Schlauchklemmen verschlossen und vertikal fixiert. Für die Besiedelung werden 26 mL einer Zellsuspension (HUVECs in EGM-2) mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durch die Tülle des inneren Kreislaufs in das Schweine-Gefäß eingefüllt ($1 \cdot 10^5$ Zellen/cm²). Parallel wird Zellkulturmedium durch die Tülle des äußeren Kreislaufs in die äußere Kammer eingefüllt. Nach erfolgtem Befüllen werden die Schläuche des inneren und des äußeren Kreislaufs an die Oberseite angeschlossen. Beide Schläuche werden ebenfalls abgeklemmt und die Kammer in horizontaler Position im Inkubator gelagert. Das Anwachsen der Zellen erfolgt innerhalb der ersten 6 h bei einer Rotationsgeschwindigkeit der Bioreaktorkammer von 5 rpm. Nach diesem Zeitraum wird das Medium durch Anschalten der Zentrifugalpumpen bei minimaler Geschwindigkeit gewechselt. Nach dem Austausch werden die Pumpen erneut abgeschaltet und das Gefäß für weitere 18 h mit 5 rpm rotiert. Nach Ablauf der 18 h wird der Volumenstrom gestartet (siehe Abschnitt 8.3.4.2).

8.3.4.2 Kultivierung im Bioreaktorsystem

Die Kultivierung des Schweine-Gefäßes erfolgt im Bioreaktorsystem nach abgeschlossener Besiedelung (siehe Abschnitt 8.3.4.1 *Besiedelung des Gefäßes im Bioreaktorsystem*) mit einer konstanten Flussrate von 50 mL/min, einer Rotation von 5 rpm, einer CO₂-Sättigung von 5% und einer Temperatur von 37°C. Die Flussrate erzeugt einen Scherstress von unter 0,5 dyn/cm², somit kann die Kultivierung als quasi-statisch angesehen werden.

Nach abgeschlossener Kultivierung werden die Zellen auf dem Gefäß durch Inkubation des Gefäßes in 4% PFA-Lösung für 30 min fixiert. Anschließend wird das Gefäß mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Analyse in PBS-Puffer im Kühlschrank gelagert.

8.3.4.3 Überprüfung der Sterilität des Zellkulturmediums nach Kultivierung im Bioreaktorsystem

Für die Überprüfung des Zellkulturmediums auf eine bakterielle Kontamination nach der Kultivierung des Schweine-Gefäßes im Bioreaktorsystem wird eine aus dem Mediumreservoir des inneren Kreislaufs des Bioreaktorsystems Probe nach Abschluss der Kultivierung steril

entnommenes Medium (10 mL) untersucht. Die Analyse erfolgt mittels qPCR unter Verwendung des Microsart RESEARCH Bacteria Kits von Sartorius Stedim gemäß der Betriebsanweisung des Herstellers.

8.3.4.4 Analyse der inneren Gefäßoberfläche des re-zellularisierten Gefäßes nach Kultivierung im Bioreaktor

Nach erfolgter Neubesiedelung des Schweine-Gefäßes und Kultivierung im Bioreaktorsystem wird die innere Oberfläche des Gefäßes mittels Paraffinschnitten und Fluoreszenzfärbungen analysiert.

8.3.4.4.1 Paraffinschnitte und H&E-Färbung

Für die Paraffinschnitte werden zwei 5 mm breite Ringe aus dem tubulären Schweine-Gefäß ausgeschnitten und vorbereitet. Ein Ring wird aus der Mitte des Gefäßes aus einem mit Zellen besiedelten Abschnitt geschnitten, als Vergleich wird ein zweiter Ring vom Ende des Gefäßes geschnitten. Da das Gefäß am Ende über den Tüllen fixiert ist, sollten dort keine Zellen vorhanden sein.

Nach Inkubation in 70% Ethanol wird das Gefäßstück in Xylol überführt, bevor es paraffiniert wird. Mittels eines Mikrotoms (2040 Autocut, Reichert-Jung, Deutschland) werden 5 µm dicke Schnitte präpariert und auf Glasobjektträgern gesammelt. Die Schnitte werden durch Inkubation in verschiedenen Lösungsmitteln in folgender Reihenfolge entwacht: Xylol 100% (10 min), Xylol 100% (10 min), Ethanol 100% (3 min), Ethanol 100% (3 min), Ethanol 96% (3 min), Ethanol 96% (3 min), Ethanol 70% (3 min), Ethanol 50% (3 min), dd. Wasser (3 min), dd. Wasser (3 min). Für die Färbung werden die Schnitte zuerst für 20 min in Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III inkubiert, danach vorsichtig mit dd. Wasser und anschließend mit Salzsäure/Ethanol-Lösung gewaschen. Vor der Eosin-Färbung werden die Schnitte noch einmal mit dd. Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgt durch Inkubation für 2 min in Eosin-Lösung (1%). Zum Abschluss werden die Schnitte 1 min mit Ethanol (70%) gewaschen und nach Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe (vgl. oben, in umgekehrter Reihenfolge ab Ethanol 70%) mit DPX eingedeckt.

8.3.4.4.2 Fluoreszenzfärbungen der inneren Gefäßoberfläche

Die Analyse der Zellen auf der Gefäßoberfläche erfolgt zusätzlich durch eine Fluoreszenzfärbung. Hierbei sollen sowohl die Zell-Zell-Kontakte als auch die Konfluenz untersucht werden. Aus dem mittleren Teil des Schweine-Gefäßes wird ein Stück (5x5 mm) heraus geschnitten. Das Gefäßstück wird vorsichtig so präpariert, dass die drei Schichten der

Gefäßwand aufgetrennt werden. Die innere Schicht der Gefäßwand (*Tunica intima*) wird vorsichtig zur Sichtbarmachung der Zellkerne, des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Kontakte gefärbt (siehe entsprechende Abschnitte unter 8.3.5 Fluoreszenzfärbungen).

8.3.5 Fluoreszenzfärbungen

Nach erfolgter Fixierung der *Scaffolds* oder Gefäßstücke werden diese zur Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Als Vorbereitung werden diese zur Permeabilisierung der Zellmembranen für 1 h in 0,1% Triton X in PBS-Puffer inkubiert und anschließend sechs Mal mit PBS-Puffer gewaschen.

8.3.5.1 Zellkernfärbung

Die Färbung der Zellkerne erfolgt durch Inkubation der *Scaffolds* und Gefäßstücke in Hoechst 33342 20 mM in PBS-Puffer (1:2000) für 10 min. Der Farbstoff bindet an die DNA im Zellkern. Anschließend wird dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs kann bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 465 nm untersucht werden.

8.3.5.2 Färbung des Zytoskeletts

Das Zytoskelett der Zellen wird mit dem Farbstoff Phalloidin-iFluor 555 gefärbt. Dieses Konjugat bindet an das Aktin des Zytoskeletts der Zellen. Die Färbung erfolgt durch Inkubation in Phalloidin-iFluor 555 in PBS-Puffer (1:1000) mit 1% BSA für 1 h. Anschließend wird das gefärbte Objekt dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs kann bei einer Anregungswellenlänge von 556 nm und bei Emissionswellenlänge von 574 nm untersucht werden.

8.3.5.3 Färbung der Zell-Zell-Kontakte durch Markierung von VE-Cadherin

Die Färbung von VE-Cadherin erfolgt mittels Immunofluoreszenz. Das *Scaffold* oder Gefäßstück wird zuerst mit einem Primär-Antikörper (1:1000) in PBS-Puffer, welcher das VE-Cadherin (Kaninchen Anti-VE-Cadherin) bindet, über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wird das Objekt dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Objekt mit Sekundär-Antikörper (1:2000) in PBS-Puffer, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, für 1 h inkubiert. Der Sekundär-Antikörper (Ziegen Anti-Kaninchen) bindet den Primär-Antikörper. Zuletzt wird das Objekt sechs Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Je nach verwendetem Fluoreszenz-Farbstoff des Sekundär-Antikörpers erfolgt die Analyse bei einer Anregungswellenlänge von 555 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 580 nm

(AlexaFluor 555) oder bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und bei Emissionswellenlänge von 518 nm (AlexaFluor 488).

8.3.6 Bioreaktor-Charakterisierung und Optimierung

8.3.6.1 Bioreaktoraufbau und Funktion

Für die Herstellung von bioartifiziellen Gefäßprothesen wird in dieser Arbeit ein spezielles Bioreaktorsystem verwendet und weiter entwickelt (Abbildung 49). Das System wird für die Herstellung von Gefäßprothesen optimiert, um optimale (physiologische) Bedingungen während der Kultivierung zu erhalten und eine genaue Überwachung dieser während des Prozesses zu ermöglichen.

Das Bioreaktorsystem besteht aus zwei Kreisläufen für das Zellkulturmedium, welche an die zentrale Bioreaktorkammer angeschlossen sind. Die zentrale Bioreaktorkammer enthält das zu kultivierende Gefäß und kann während der Kultivierung mit variabler Geschwindigkeit $\pm 180^\circ$ rotiert werden, um Gravitationseffekte zu vermeiden. Im inneren Kreislauf fließt das Zellkulturmedium durch die zu kultivierende Gefäßprothese und erzeugt somit den für die Endothelialisierung notwendigen Scherstress auf der inneren Gefäßoberfläche. Das Zellkulturmedium, welches im äußeren Kreislauf zirkuliert, umfließt das Gefäß in der zentralen Bioreaktorkammer und simuliert somit das *Interstitium*. Zusätzlich wird das Gefäß von außen mit den notwendigen Nährstoffen versorgt.

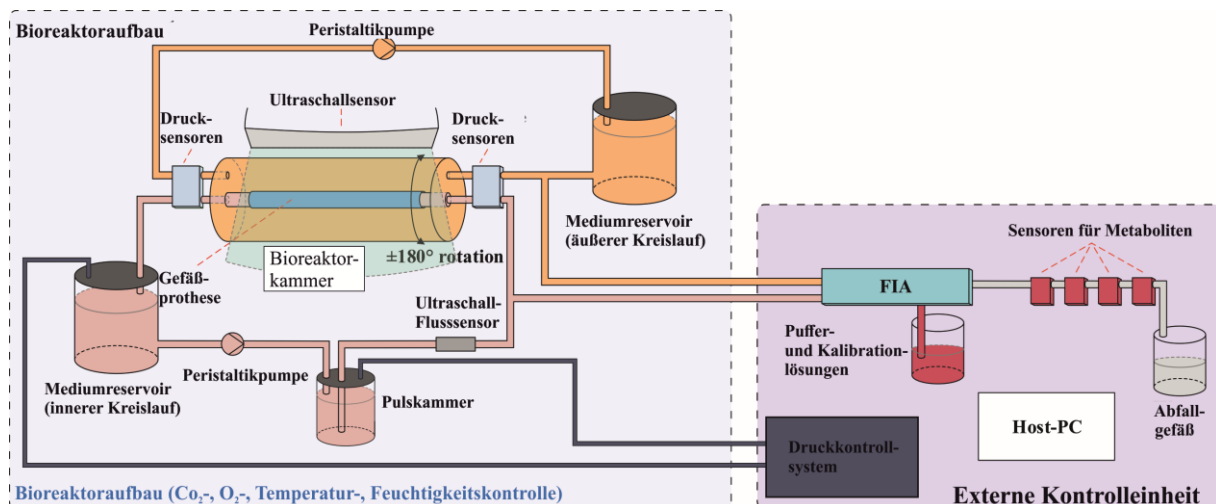


Abbildung 49: Schematischer Aufbau des Bioreaktorsystems. Das Bioreaktorsystem besteht aus einem inneren (rot) und einem äußeren (orange) Kreislauf zur Versorgung der Gefäßprothese. An den inneren Kreislauf ist ein Drucksystem zur Erstellung eines Druckpulses angeschlossen. Ebenfalls ist eine Fließinjektionsanalyse an die Kreisläufe zur sterilen Entnahme und Analyse von Proben des Zellkulturmediums angeschlossen.

In beiden Kreisläufen wird das Zellkulturmedium mittels Zentrifugalpumpen transportiert. In dem inneren Kreislauf ist zusätzlich zum Mediumreservoir (Volumen: 250 mL) noch eine

Pulskammer (Volumen: 250 mL) integriert, welche an ein externes Präzisionsdrucksystem angeschlossen ist. Zusätzlich zur erzeugten Basis-Flussrate kann ein Druckpuls erzeugt werden. Durch den Anschluss des Drucksystems an das Mediumreservoir des inneren Kreislaufs kann ebenfalls ein Gegendruck dort angelegt werden, somit kann der Gesamtdruck im System individuell angepasst werden. Das Drucksystem kann einen Druck zwischen – 500 mbar bis + 500 mbar erzeugen. Vor und hinter der zentralen Bioreaktorkammer kann der Druck mittels der im Kreislauf integrierten Sensoren gemessen werden. Die Flussrate des inneren Kreislaufs wird mit einem Ultraschallsensor hinter der zentralen Bioreaktorkammer gemessen.

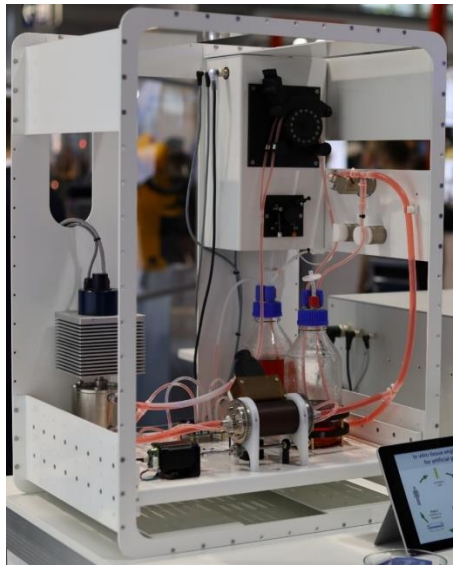


Abbildung 50: Aufgebautes Bioreaktorsystem.

Die Analyse metabolischer Parameter kann während der Kultivierung ebenfalls durchgeführt werden. Hierfür können durch eine Fließ-Injektions-Analyse (FIA) steril Proben entnommen werden und analysiert werden.

8.3.6.2 Aufbau des FIA-Systems zur sterilen Entnahme von Proben während der Kultivierung

Das FIA-System wird zu Testzecken mit einer dynamischen Zellkultivierung von HUVECs auf *Flowslides*, unter Verwendung eines speziellen Pumpsystems verbunden (siehe „Auswirkungen dynamischer Kultivierung von endothelialen Vorläufer-Zellen im Vergleich zu HUVECs auf EZM-Protein“, Masterarbeit von Gresa Hasani). Mit dem FIA-System werden täglich je 500 μ L Probe steril aus dem Versuchsaufbau entnommen und in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Proben werden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

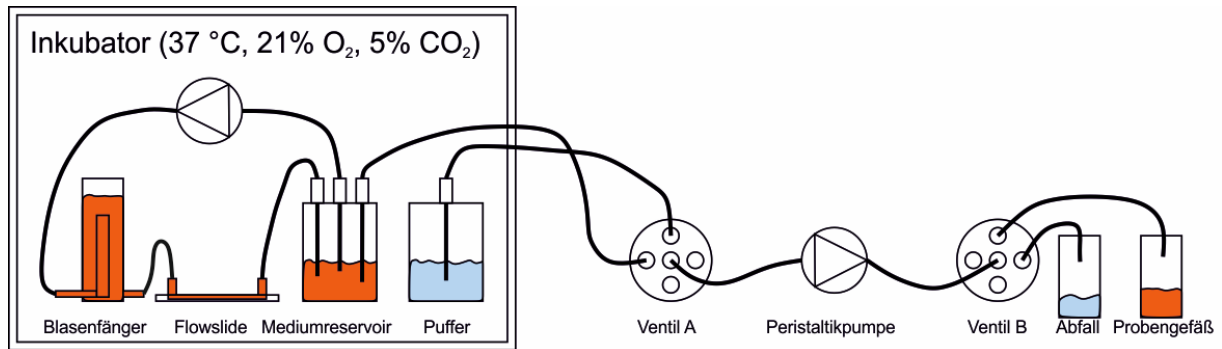


Abbildung 51: Schematischer Aufbau der FIA (mit angeschlossenem Experiment zur Kultivierung von HUVECs auf Flowslides unter dynamischen Bedingungen). Die FIA besteht aus zwei Ventilen und einer Peristaltikpumpe. Über Ventil A wird entweder die Probe oder eine Puffer-Lösung zum Reinigen der Schläuche selektiert. Mit Ventil B wird diese Probe entweder in ein Abfall-Gefäß oder in den Probenbehälter geleitet.

8.3.6.3 Verwendete Test-Gefäßstrukturen

Für die Charakterisierung des Bioreaktorsystems werden drei verschiedene Gefäßstrukturen verwendet, um zu analysieren, ob sich durch die abweichende Oberflächenstruktur und Elastizität Auswirkungen auf den resultierenden Druck und die Flussrate ergeben.

Als Standard wird ein Silikonschlauch (Abbildung 52A) verwendet. Dieser wird sowohl mit einer 3D-gedruckten Röhre (Abbildung 52B), als auch mit einem dezellularisierten Gefäß eines Schweines (Abbildung 52C) verglichen. Alle Gefäßstrukturen verfügen über einen Innendurchmesser von ca. 8 mm. Die Gefäße werden an den inneren Tüllen der Deckel der zentralen Bioreaktorkammer (Abbildung 52D) fixiert. Der Silikonschlauch und die 3D-gedruckte Röhre können aufgrund ihrer geeigneten Elastizität ohne weitere Fixierungshilfe befestigt werden. Das dezellularisierte Gefäß eines Schweines wird aufgrund der sehr hohen Elastizität mittels Kabelbindern zusätzlich fixiert.

Eine dezellularisierte Arterie wird zusätzlich für die Test-Besiedelung im Bioreaktorsystem verwendet. Aufgrund der notwendigen Sterilität wird in diesem Fall die Befestigung mittels sterilem, chirurgischem Nahtmaterial durchgeführt.

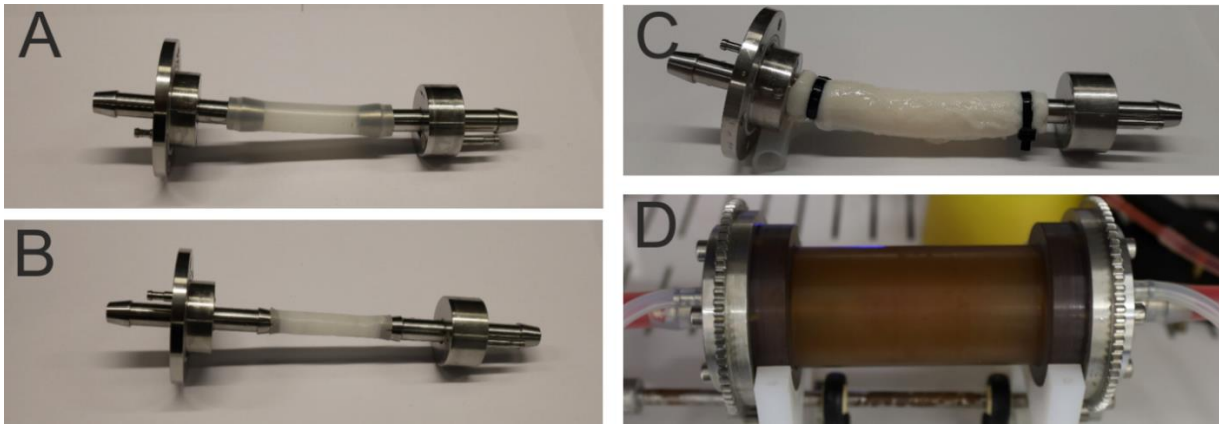


Abbildung 52: An die Tüllen der zentralen Bioreaktorkammer angeschlossene Gefäß-Teststrukturen und zentrale Bioreaktorkammer. Zur Untersuchung der strömungsmechanischen Eigenschaften wurden verschiedene Teststrukturen in die zentrale Bioreaktorkammer (D) eingesetzt. A: Silikonschlauch (ID = 8 mm); B: 3D-gedruckte PLA-Röhre (ID = 8 mm); C: Dezellularisiertes Gefäß eines Schweins (ID ~ 8 mm).

8.3.6.4 Erhöhung der Viskosität durch Zugabe von Methylcellulose und Viskositätsmessungen

Die Viskosität des verwendeten Mediums wird durch die Zugabe von Methylcellulose (MC) angepasst, um bei gleichen Flussraten höheren Scherstress im tubulären Gefäß erreichen zu können. Vor Verwendung wird die MC durch autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 20 min sterilisiert. Das Lösen der MC im vorgewärmten Medium (37 °C) erfolgt unter Rühren für mehrere Stunden. Anschließend wird die Suspension bis zum vollständigen Lösen der MC bei 4 °C gelagert.

Die Viskosität von Wasser, Zellkulturmedium (EGM-2) und Zellkulturmedium (EGM-2) mit 0,5%, 1%, 2% und 2,5% MC wird mit einem Rotationsviskosimeter (MCR 302) bestimmt. Alle Proben und der Probensteller werden auf 37 °C vortemperiert. Zur Messung werden 670 µL Probe auf den Probensteller aufgetragen. Um das Verdampfen der Probe während der Messung zu verhindern, wird der Ring um den Probensteller mit Wasser gefüllt und die Messsonde samt Probe abgedeckt. Als Messsonde wird ein runder, planer Aufsatz mit einem Durchmesser von 39,980 mm (PP40) verwendet. Der Messspalt beträgt 0,5 mm. Die Messungen werden bei 37 °C durchgeführt. Die Schubspannung wird für die Scherrate 10-1000 1/s gemessen. Es werden bei einer logarithmischen Steigung von 21,5 Pkt./dec 44 Messpunkte bestimmt. Die Messdauer pro Punkt beginnt bei 100 s für eine Scherrate von 10 1/s und endet bei 5 s für eine Scherrate von 1000 1/s. Aus der Schubspannung kann die Viskosität abhängig von der Scherrate berechnet werden. Alle Messungen werden dreifach durchgeführt. Auf Basis der Messwerte wird für jede Lösung ein nicht-Newtonsches Viskositätsmodell mit der folgenden Formel in MS Excel berechnet.

$$\mu = m * \max(\gamma, \gamma_{min})^{n-1} \quad (1)$$

mit der Viskosität μ , der Scherrate γ und dem unteren Scherratenlimit γ_{min} .

8.3.6.5 Messung der Verweilzeitverteilung

Damit potentielle Verwirbelungen und Toträume innerhalb der zentralen Bioreaktorkammer im inneren Kreislauf identifiziert werden können, wird die Messung der Verweilzeit eines *Tracers* durchgeführt. Für die Messung wird oberhalb der zentralen Bioreaktorkammer kurz hinter der Pulschammer der Tracer über ein T-Verbindungsstück und eine angeschlossene 1 mL Spritze mit einem Dirac-Stoß injiziert. Als Tracer wird je Messung 1 mL einer Uracil-Lösung mit einer Konzentration von 200 ppm verwendet. Hinter der zentralen Bioreaktorkammer wird die Absorption mit einem Genesys 10S UV-Vis Spektrophotometer für bis zu 90 s bei 254 nm gemessen. Die gemessenen Verweilzeitverteilungen $E(t)$ werden anschließend normiert auf die Gesamtfläche des jeweiligen Integrals.

$$E(t) = \frac{C_t - C_0}{\int_0^{\infty} [C_t - C_0] dt} = 1 \quad (1)$$

Aus der normierten Verweilzeitverteilung $E(t)$ wird die Verweilzeitsummenkurve $H(t)$ berechnet.

$$H(t) = \int_0^t E(t') dt' \leq 1 \quad (2)$$

Mit Hilfe der Verweilzeitsummenkurve $H(t)$ erhält man die mittlere Verweilzeit \bar{t} nach:

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t H(t) dt \quad (3)$$

Das bedeutet, die mittlere Verweilzeit kann durch Bestimmung der Fläche zwischen Verweilzeitsummenkurve und Ordinate bestimmt werden.

Die Messungen werden mit Wasser als Medium bei unterschiedlichen Flussraten von 50 mL/min, 100 mL/min und 200 mL/min durchgeführt. Zusätzlich wird die Verweilzeitverteilung für eine 1% Methylcellulose-Lösung bei 200 mL/min gemessen.

8.3.6.6 Messung von Druck und Volumenstrom

Um einen Zusammenhang zwischen der Druckdifferenz zwischen Pulschammer und Mediumreservoir und der resultierenden Flussrate herzustellen, werden feste Druckdifferenzen mit dem Drucksystem eingestellt und die Flussrate mittels Ultraschallsensor gemessen. Dabei

wird als Test-Medium Wasser verwendet und zusätzlich mit Wasser mit 0,5% Methylcellulose und Wasser mit 1% Methylcellulose verglichen. Zur Vorbereitung der Messung wird das Druckgefäß vollständig gefüllt und die Zentrifugalpumpe anschließend gestoppt. Bei Beginn der Messung von Druck und Flussrate wird die Druckdifferenz mittels des Drucksystems zwischen Pulschammer und Mediumreservoir eingestellt. Die Messung wird solange durchgeführt, bis eine konstante Flussrate über einen Zeitraum von 5 Sekunden erkennbar ist. Die Messungen werden für Druckdifferenzen zwischen 25 mbar bis 250 mbar durchgeführt, da das gesamte Flüssigkeitsvolumen der Pulschammer bei einer höheren Druckdifferenz vor Einstellung einer konstanten Flussrate aufgebraucht ist. Der Basisdruck wird durch Anlegen eines identischen Druckes im Mediumreservoir und in der Pulschammer zwischen 0 mbar, 50 mbar und 100 mbar variiert. Zusätzlich wird für jedes Medium die Flussrate bei einem Druck von 500 mbar sowie und laufender Zentrifugalpumpe bestimmt. Jede Messung wird dreifach durchgeführt. Alle Messungen werden bei 37 °C durchgeführt.

8.3.6.7 Erzeugung exemplarischer Druckpulse

Mittels des Drucksystems kann während der Kultivierung ein pulsationales Druckprofil erzeugt werden, um einen pulsationalen Volumenstrom zu erzeugen. Als Beispiele werden ein niedriges, ein mittleres und ein hohes Druckprofil eingestellt. Die Druckpulse werden mit folgender Formel eingestellt:

$$p_{\text{Pulschammer}} = ((\sin t) + 0.632 * \sin(2t) + 0.296 * \sin(3t) + 0.222 * \sin(4t) + 0.148 * \sin(5t) + 0.118 * \sin(6t)) * 15) + x \quad (4)$$

Die erzeugten exemplarischen Druckprofile (siehe Tabelle 16 für Parameter) entsprechen einem normalen (120/80 mm/Hg), einem hypotonischen (80/40 mbar) und einem hypertonen (200/130 mbar) Druck im menschlichen Körper. Um potentielle Unterschiede im Druckprofil abhängig von der verwendeten Gefäßstruktur zu identifizieren, werden verschiedene Gefäßstrukturen (siehe Abschnitt *Verwendete Test-Gefäßstrukturen*) in die zentrale Bioreaktorkammer eingesetzt und der resultierende Druck und Volumenstrom beim Anlegen des hohen Druckprofils analysiert. Jede Messung wird dreifach bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 16: Parameter zur Erzeugung exemplarischer Druckpulse mittels Formel 4 (Abschnitt 8.3.6.7)

Druckprofil	Parameter x	Druck im Mediumreservoir [mbar]
Mittleres Druckprofil	130	60
Hohes Druckprofil	240	60
Niedriges Druckprofil	65	35

8.3.6.8 CFD-Simulation zur Abschätzung des Scherstresses auf der inneren Gefäßoberfläche

Die korrekte Abschätzung des Scherstresses ist ein wichtiger Parameter für die erfolgreiche Endothelialisierung einer Gefäßprothese. Um den Scherstress im Bioreaktorsystem abzuschätzen, wird eine CFD-Simulation in Comsol Multiphysics erstellt. Das Single-Phase Fluid Flow-Interface von Comsol Multiphysics basiert auf den Navier-Stokes-Gleichungen. Diese beschreiben die Strömung von Fluiden.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla * (\rho u) = 0 \quad (5)$$

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho(u * \nabla)u = \nabla * [-pI + \tau] + F \quad (6)$$

$$\rho C_p \left(\frac{\partial T}{\partial t} + (u * \nabla)T \right) = -(\nabla * q) + \tau : S - \frac{T}{\rho} \frac{\partial \rho}{\partial T} \bigg|_p \left(\frac{\partial \rho}{\partial t} + (u + \nabla)p \right) + Q \quad (7)$$

Die Masseerhaltung ist in Gleichung (5) formuliert, die Impulserhaltung in Gleichung (6) und die Energieerhaltung in Gleichung (7). Dabei ist p der Druck, F die Volumenkraft, C_p die spezifische Wärmekapazität, T die absolute Temperatur, q der Wärmestrom, Q enthält die Wärmequelle und S ist der Tensor der Dehnrate.

Als Basis wird eine 2D-achsensymmetrische Geometrie mit einem physikalischen Modell für laminaren Fluss verwendet. Die erstellte Geometrie bildet das Fluidvolumen im inneren Kreislauf der zentralen Bioreaktorkammer bei einem Gefäß mit einem Radius von 4 mm ab. Als Viskositätsmodell werden die Parameter der zuvor berechneten nicht-newtonschen

Viskositätsmodelle (siehe Abschnitt *Erhöhung der Viskosität durch Zugabe von Methylcellulose und Viskositätsmessungen*) verwendet. Zur Zerlegung der Geometrie in kleinere Untereinheiten bei der Berechnung wird die Einstellung „feiner“ verwendet. Als Randbedingung für das Fluid an der Gefäßwand wird „kein gleiten“ gesetzt. Damit ist die Flussgeschwindigkeit an der Wand 0. Bei der Berechnung des Scherstress für einen konstanten Wert wird eine stationäre Studie durchgeführt, bei der Berechnung für ein pulsatile Flussprofil wird eine zeitabhängige Studie (Intervall = 0,1 s), basierend auf den gemessenen Werten der Flussrate über einen Zeitraum von 12 s, durchgeführt. Der Scherstress auf der inneren Oberfläche wird für jeden berechneten Zeitpunkt über den mittleren Bereich des Gefäßes gemittelt.

Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

Sebastian Loewner

Masterarbeit im Studiengang Life Science vom 09.04.2018-09.10.2018

Titel: PDO als *Scaffold*-Material für *Tissue Engineering* – Verarbeitung und Charakterisierung

Gresa Hasani

Masterarbeit im Studiengang Life Science vom 10.07.2018-15.01.2019

Titel: Auswirkungen dynamischer Kultivierung von endothelialen Vorläufer-Zellen im Vergleich zu HUVECs auf EZM-Protein

Nils Leeker

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie vom 01.10.2018-05.04.2019

Titel: 3D-Druck von HUVECs in einem geeigneten Alginat-basierten Hydrogel

Jannis Renzelmann

Masterarbeit im Studiengang Life Science vom 02.06.2020-02.12.2020

Titel: Entwicklung einer Kultivierungsstrategie zur Endothelialisierung einer 3D-Oberfläche

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Gefäßsystems. Modifiziert nach (Jessica I. Gupta und Michael J. Shea 2019).....	5
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand. Modifiziert nach (Encyclopædia Britannica).....	6
Abbildung 3: Ablauf der Angiogenese. Die Bindung von VEGF an die VEGF-Rezeptoren induziert die Expression von Dll4 in <i>Tip</i> -Zellen (blau), welches an Notch-Rezeptoren benachbarter Endothelzellen bindet. Dies unterdrückt die Expression des VEGF-Rezeptors und verstärkt die Proliferation der Endothelzellen, welche als <i>Stalk</i> -Zellen (grün) die Basis für das neue Gefäß ausbilden. Modifiziert nach (Herbert und Stainier 2011).	9
Abbildung 4: Ausbildung des Lumens in Kapillargefäßen. Das Lumen in den Kapillargefäßen erfolgt durch die Bildung einer negativen Ladung an den Glykoproteinen auf der apikalen Seite der Endothelzellen.	9
Abbildung 5: Scaffold-Degradation und Geweberegeneration. Nach der Herstellung des Gewebekonstruktes wird der Großteil der mechanischen Stabilität durch das Polymer- <i>Scaffold</i> getragen. Durch die Reifung des Gewebes nimmt dessen mechanische Stabilität zu und das Gewebe übernimmt die Funktion des Polymers. Modifiziert nach van Lith und Ameer (van Lith und Ameer 2011).....	14
Abbildung 6: Übersichtsaufnahmen und mikroskopische Aufnahmen der mittels 3D-Druck und Salzlaugung hergestellten Scaffolds. Für einen initialen Vergleich der <i>Scaffold</i> -Strukturen wurden Übersichtsaufnahmen der 3D-gedruckten <i>Scaffolds</i> (oben links, mittig rechts) und der durch Salzlaugung hergestellten <i>Scaffolds</i> (unten links) sowie mikroskopische Aufnahmen der 3D-gedruckten <i>Scaffolds</i> (oben rechts) und der durch Salzlaugung hergestellten <i>Scaffolds</i> (unten rechts) gemacht.....	27
Abbildung 7: Ergebnisse der CTB-Tests zur Untersuchung der Biokompatibilität der PDO-Scaffolds. Für die Untersuchung der Biokompatibilität der PDO- <i>Scaffolds</i> wurde jeweils ein Extrakt durch Inkubation des PDO-Filaments und der mittels Salzlaugung hergestellten <i>Scaffolds</i> in Zellkulturmedium bei 37 °C gewonnen. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Extrakt inkubiert und anschließend der Umsatz von Resazurin zu Resorufin im Vergleich zu einer unbehandelten Probe bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.	28
Abbildung 8: Hergestellte Testkörper für die Analyse der mechanischen Eigenschaften der PDO-Scaffolds. Für die Analyse der mechanischen Eigenschaften wurden Testkörper nach	

DIN EN ISO 527-2:2012 vom Typ 1BB mittels 3D-Druck (links) mit einem Auffüllgrad von 25% und vom Typ 1BA mittels Salzlaugung (rechts) hergestellt. 29

Abbildung 9: Erste Besiedelungsversuche mit den hergestellten *Scaffolds*. Zur Testung der *Scaffolds* für das *Tissue Engineering* wurden sowohl durch Salzlaugung hergestellte *Scaffolds* (oben) als auch 3D-gedruckte *Scaffolds* (unten) mit 250.000 HUVECs und 50.000 MSCs besiedelt und für 14 Tage bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂ inkubiert. Die Bilder zeigen Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der *Scaffolds*. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau), das Zytoskelett mit Phalloidin-iFluor 555 (rot). 30

Abbildung 10: Vergleich der Oberflächenstruktur poröser PDO-*Scaffolds* vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen. Die *Scaffolds* wurden für vier Wochen bei 37 °C im Inkubator in PBS-Puffer inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde die Oberflächenstruktur der *Scaffolds* mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. 31

Abbildung 11: μ Ct-Aufnahmen eines porösen PDO-*Scaffolds* vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen und rekonstruierte Geometrie. Die innere Struktur der porösen PDO-*Scaffolds* wurde mittels μ CT vor und nach Inkubation in PBS-Puffer für vier Wochen bei 37 °C untersucht. Die Abbildung zeigt je einen Querschnitt durch das *Scaffold* vor und nach Inkubation sowie eine rekonstruierte 3D-Geometrie. 32

Abbildung 12: Prozentualer Gewichtsverlust der porösen PDO-*Scaffolds* nach Inkubation in PBS-Puffer. Für die Analyse der Degradation der porösen PDO-*Scaffolds* wurden diese bei 37 °C in PBS inkubiert und der prozentuale Gewichtsverlust an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. 33

Abbildung 13: Instabile, poröse PDO-*Scaffolds* nach Inkubation in PBS-Puffer länger als 4 Wochen. Bei einer Inkubation länger als 4 Wochen in PBS-Puffer bei 37 °C wurden die *Scaffolds* instabil und zerfielen bei Berührung. 33

Abbildung 14: Ergebnisse der mittels Nanoindentation ermittelten Werte für den effektiven Young's Modulus. Vier verschiedene *Scaffolds* wurden mittels Nanoindentation untersucht. Ein poröses PDO-*Scaffold*, ein zusätzlich mit Fibrin beschichtetes, poröses PDO-*Scaffold* und zwei mit Zellen besiedelte, mit Fibrin beschichtete, poröse PDO-*Scaffolds* (eines nach einem Tag Inkubation und eines nach 28 Tagen Inkubation bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂). 34

Abbildung 15: Übersichtsaufnahme besiedelter *Scaffolds* nach sieben und 28 Tagen Inkubation. Die *Scaffolds* wurden mit 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs besiedelt und bei 37 °C, 21% O₂ und 5% O₂ für 7 und 28 Tage inkubiert. 35

Abbildung 16: Ergebnisse der SDS-PAGE und des Western Blot zur Analyse des mittels Kryopräzipitation isolierten Proteinpräzipitats aus Leukozyten-reduziertem Blutplasma.

Das aus Leukozyten-reduziertem Blutplasma durch Kryopräzipitation gewonnene Proteinpräzipitat wurde zuerst mit einer SDS-PAGE mit sowohl nicht-reduzierendem (A) und reduzierendem (B) Probenpuffer untersucht. Im zweiten Schritt wurde ein Western Blot zum Nachweis der Fibrinogen- α -Kette (C) durchgeführt. Untersucht wurden jeweils eine Probe von kommerziell erhältlichem Fibrinogen (1) und das selbst gewonnene Proteinpräzipitat vor (2) und nach (3) Dialyse mit einem MWCO von 100 kDa. 37

Abbildung 17: Optimierung des Zellzahlverhältnisses. Für die Optimierung des Zellzahlverhältnisses wurden HUVECs und MSCs im Verhältnis 50.000/250.000 (1: 5), 100.000/150.000 (2:3) und 250.000/50.000 (5:1) auf den *Scaffolds* angesiedelt und für 14 Tage mit 50% konditioniertem α MEM und 50% frischen, basalem α MEM kultiviert. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP exprimierenden HUVECs nach zehn und 14 Tagen Kultivierung. 40

Abbildung 18: Auswirkungen der Zugabe von frischem HS zum konditionierten Zellkulturmedium im Vergleich zu frischem, voll supplementiertem Zellkulturmedium.

Die Auswirkungen der Zugabe von 2% frischem HS zum Zellkulturmedium aus konditioniertem α MEM und basalem EGM-2 im Vergleich zu einer 1:1 Mischung aus frischem α MEM und voll supplementiertem EGM-2 wurde nach Kultivierung von 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* untersucht. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP exprimierenden HUVECs nach sieben Tagen Kultivierung. 42

Abbildung 19: Bedeutung der MSCs für die Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-*Scaffolds*.

Zur Untersuchung der Bedeutung von MSCs für die Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-*Scaffolds* wurden entweder nur HUVECs oder eine Kokultur aus HUVECs und MSCs auf die *Scaffolds* angesiedelt (100.000 HUVECs/150.000 MSCs) und für sieben Tage kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde α -MEM/EGM-2 (1:1) mit 2% HS, 10 ng/mL VEGF und 10 ng/mL bFGF verwendet. A: HUVECs in Kokultur mit MSCs, Übersichtsaufnahme. B: HUVECs in Monokultur, Übersichtsaufnahme. C: HUVECs in Kokultur mit MSCs, Detailaufnahme, Zellkerne sind zusätzlich mit Hoechst 33342 gefärbt. 44

Abbildung 20: Aufnahme eines Paraffinschnittes durch ein mit HUVECs und MSCs besiedeltes PDO-*Scaffold*.

Das *Scaffold* wurde mit HUVECs und MSCs in einem Verhältnis von 2:3 besiedelt. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei 37 °C, 21% O₂ und 5% CO₂. Das Bild zeigt eine Phasenkontrast-Aufnahme eines 5 μ m Paraffinschnittes. 44

- Abbildung 21: Scaffold-Bewuchs und Netzwerkbildung nach Besiedelung ohne Fibrinbeschichtung nach sechs Tagen in Kultur.** HUVECs und MSCs wurden in einem Verhältnis von 2:3 (100.000:150.000) auf den *Scaffolds* angesiedelt und für sechs Tage kultiviert. Während der Besiedelung wurde auf die Beschichtung der *Scaffolds* mit Fibrin verzichtet. 45
- Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Netzwerkbildung von HUVECs auf porösen PDO-Scaffolds.** Die HUVECs wurden in Ko-Kultur mit MSCs (100.000/150.000 Zellen) auf porösen, mit Fibrin beschichteten PDO-*Scaffolds* für sieben Tage kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde α -MEM/EGM-2 (1:1) mit 2% HS, 10 ng/mL VEGF und 10 ng/mL bFGF verwendet. 46
- Abbildung 23: Netzwerkbildung auf Scaffolds nach Kultivierung mit Zellkulturmedien mit unterschiedlicher Konzentration an Wachstumsfaktoren.** Die HUVECs in Kokultur mit MSCs wurden auf den porösen PDO-*Scaffolds* für sieben Tage kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF, bFGF und Hydrocortison versetzt. Verwendet wurden die Konzentrationen 10/10/0 ng/mL (VEGF/bFGF/Hydrocortison; Medium 1), 10/10/20 ng/mL (Medium 2), 20/20/0 ng/mL (Medium 3) und 20/20/20 ng/mL (Medium 4). 47
- Abbildung 24: Ablauf der Netzwerkanalyse mit anschließender AngioTool-Auswertung.** Die Auswertung der Netzwerkstrukturen der HUVECs auf den porösen PDO-*Scaffolds* wurde in vier Schritten durchgeführt. A: Aufnahme von konfokalen Fluoreszenzbildern. B: Erstellung einer Überlagerung der Einzelbilder. C: Erstellung einer Maske. D: Analyse mit AngioTool. 48
- Abbildung 25: Ergebnisse der Netzwerkanalyse mittels AngioTool.** Die Auswirkungen der Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Hydrocortison im Zellkulturmedium wurden nach sieben Tagen Kultivierung von 100.000 HUVECs und 150.000 MSCs auf porösen PDO-*Scaffolds* mittels AngioTool analysiert. Untersucht wurden: Medium 1 mit 10 ng/mL VEGF und bFGF, Medium 2 mit 10 ng/mL VEGF und bFGF und 20 ng/mL Hydrocortison, Medium 3 mit 20 ng/mL VEGF und bFGF und Medium 4 mit 20 ng/mL VEGF und bFGF und 20 ng/mL Hydrocortison. Ebenfalls wurde die Auswirkung der Verwendung von Kryopräzipitat in Kombination mit Medium 4 im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Fibrinogen untersucht. 49
- Abbildung 26: Vergleich der Netzwerkbildung auf PDO-Scaffolds nach Beschichtung mit kommerziell erhältlichem Fibrinogen oder Kryopräzipitat und Abschätzung des Abstandes der einzelnen Stränge.** Die Auswirkung der Verwendung von Kryopräzipitat mit

Medium 4 (B) im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Fibrinogen (A) auf die
 Netzbildung von HUVECs in Kokultur mit MSCs (100.000:150:000) wurde nach sieben
 Tagen Kultivierung untersucht. Zusätzlich wurde eine Abschätzung des Abstandes der
 einzelnen Stränge in der Projektion vorgenommen. 50

**Abbildung 27: Verifikation des Lumens innerhalb der Netzwerkstrukturen mit Hilfe
 eines Dextran-Assays.** Das Bild (eine 2D-Projektion eines z-Stapels) zeigt beispielhaft einen
 Ausschnitt der Netzwerkstrukturen (GFP-HUVECs, grün) auf einem *Scaffold* nach sieben
 Tagen Kultivierung. Von Tag sechs auf Tag sieben wurde fluoreszenzmarkiertes Dextran
 (Texas red, rot) zum Medium (hier Medium 4, siehe Abschnitt 8.3.3.5) hinzugefügt. Rechts und
 unterhalb der Projektion sind jeweils die Seitenansichten des z-Stapels entlang der gelben
 Linien dargestellt. 51

Abbildung 28: Foto des aufgebauten inneren Kreislaufs des Bioreaktorsystems. Das Foto
 zeigt den aufgebauten inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems im Inkubator. 53

Abbildung 29: Drucksensoren und Ultraschall-Flusssensor. A: Mit dem Bioreaktorsystem
 verbundene Drucksensoren. B: Ultraschall-Flusssensor. 53

**Abbildung 30: Graphische Darstellung der Viskositätswerte für die verschiedenen EGM-
 2/MC-Lösungen und der darauf basierenden Potenzgesetz-Modelle für Nicht-Newtonsche
 Fluide.** Für EGM-2, EGM-2 mit 0,5% MC, EGM-2 mit 1% MC, EGM-2 mit 2% und EGM-2
 mit 2,5% MC wurde die Schubspannung bei Scherraten zwischen 5 bis 1000 1/s gemessen und
 die dynamische Viskosität berechnet. Auf Basis der Messwerte wurde jeweils ein
 Potenzgesetzmodell angepasst. 54

**Abbildung 31: Normierte Verweilzeitverteilung und mittlere Verweilzeit bei
 unterschiedlicher Flussrate mit gleicher Viskosität und unterschiedlicher Viskosität mit
 gleicher Flussrate.** Die Verweilzeitverteilung wurde im ersten Versuch bei Flussraten von
 50 mL/min (schwarz), 100 mL/min (rot) und 200 mL/min (blau) gemessen (oben). Im zweiten
 Versuch wurde die Verweilzeitverteilung von Wasser (schwarz) und Wasser mit 1% MC (rot)
 bei einer Flussrate von 200 mL/min verglichen (unten). Aus den Absorptionskurven wurde
 jeweils die auf die Fläche der Kurve normierte Verweilzeitverteilung berechnet und
 anschließend die mittlere Verweilzeit bestimmt. 56

**Abbildung 32: Graphische Darstellung der aus einer unterschiedlichen Druckdifferenz
 resultierenden Flussrate für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität.** Für die drei Fluide
 Wasser, Wasser mit 0,5% MC und Wasser 1% MC wurde die aus verschiedenen
 Druckdifferenzen resultierende Flussrate gemessen. Hierfür wurden Druckdifferenzen bis
 250 mbar analysiert. Zusätzlich wurde der Basisdruck im System 50 und 100 mbar erhöht. . 57

Abbildung 33: Exemplarische Druckprofile, die im Bioreaktorsystem angelegt werden können. Die drei exemplarisch erstellten Druckprofile repräsentieren ein hypotonisches (80/40 mmHg), ein normales (120/80 mmHg) und ein hypertonisches (200/130 mmHg) Druckprofil.....	58
Abbildung 34: Vergleich des hypertonischen Druckprofils bei unterschiedlichen Gefäßstrukturen. Der Druck und die Flussrate beim Anlegen des hypertonischen Druckprofils (200/130 mmHg) wurden im inneren Kreislauf des Bioreaktorsystems mit drei unterschiedlichen Gefäßstrukturen gemessen. Als unterschiedliche Gefäßstrukturen wurden ein Silikonschlauch, eine 3D-gedruckte Röhre und eine Arterie aus einem Schwein in die zentrale Bioreaktorkammer eingesetzt.....	60
Abbildung 35: Simulierter Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese bei unterschiedlichen konstanten Flussraten bis 500 mL/min für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität. Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese wurde mit COMSOL Multiphysics für verschiedene konstante Flussraten simuliert. Dabei wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell aus Tabelle 3 zur Beschreibung der Viskosität von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen von MC verwendet.....	61
Abbildung 36: Simulierter Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese bei einem Flussprofil auf Basis eines normalen und hypertonischen Druckprofils für Fluide mit unterschiedlicher Viskosität. Der Scherstress auf der inneren Oberfläche der Gefäßprothese wurde mit COMSOL Multiphysics für ein Druckprofil auf Basis des normalen Druckprofils (oben) und des hypertonischen Druckprofils (unten) aus Abschnitt 4.3.5 berechnet. Dabei wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell aus Tabelle 3 zur Beschreibung der Viskosität von EGM-2-Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Anteilen von MC verwendet.	62
Abbildung 37: Glukosemessung zur Evaluation des FIA-Systems. Zur Evaluation des FIA-Systems und der Glukosesensoren wurden Glukose-Lösungen mit einer Konzentration von 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM und 25 mM vermessen.	63
Abbildung 38: Besiedlungsstrategie für eine bioartifizielle Gefäßprothese als Vorbereitung der Kultivierung im entwickelten Bioreaktorsystem. Die Besiedelung der Gefäßprothese erfolgt in drei Schritten. A: Eine Zellsuspension (rot) mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ HUVECs/mL wird vorbereitet und in eine Spritze gefüllt. B: Parallel zur Befüllung des inneren Kreislaufs der zentralen Bioreaktorkammer mit der Zellsuspension wird der äußere Kreislauf mit frischem Zellkulturmedium (orange) gefüllt. C: Nach Einfüllen der Zellsuspension und des frischen Zellkulturmediums werden die an die zentrale	

- Bioreaktorkammer angeschlossenen Schläuche abgeklemmt und die Bioreaktorkammer für sechs Stunden im Inkubator mit 5 RPM rotiert. Danach wird das Medium ausgetauscht und das Gefäß für weitere 18 Stunden rotiert. 66
- Abbildung 39: Phasenkontrastaufnahmen von Querschnitten der inneren Oberfläche des mit HUVECs re-zellularisierten Gefäßes nach Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem.** A: Besiedelter Abschnitt. B: Unbesiedelter Abschnitt. Die Kreise markieren sichtbare Zellkerne. 67
- Abbildung 40: Fluoreszenzfärbung von fixierten HUVECs auf der inneren Gefäßoberfläche nach sieben Tagen Kultivierung im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen ($<0,5 \text{ dyn/cm}^2$).** Die Zellkerne (blau) sind mit Hoechst 33342 angefärbt und die VE-Cadherine (rot) sind mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. A: Übersichtsaufnahme der Gefäßoberfläche. B: Detailaufnahme der gefärbten Zell-Zell-Kontakte. 68
- Abbildung 41: Fluoreszenzfärbung von fixierten HUVECs auf der inneren Gefäßoberfläche nach sieben Tagen Kultivierung im Bioreaktorsystem unter quasi-statischen Bedingungen ($<0,5 \text{ dyn/cm}^2$).** Die Zellkerne (blau) sind mit Hoechst 33342 angefärbt und die Aktinfilamente (rot) sind mittels Phalloidin-iFluor visualisiert. A: Gefärbte Zellkerne. B: Markierte Aktinfilamente. 68
- Abbildung 42: Messung der Glukosekonzentration des Zellkulturmediums nach der Kultivierung für sieben Tage im Bioreaktorsystem im Vergleich zu einer Standard-Lösung und frischem EGM-2 Zellkulturmedium.** Die gemessene Glukosekonzentration der Proben beträgt: Standard-Lösung 1,04 g/L ($\pm 0,015 \text{ g/L}$), Probe des EGM-2-Zellkulturmediums nach Kultivierung im Bioreaktorsystem 1,01 g/L ($\pm 0,078 \text{ g/L}$), frisches EGM-2-Zellkulturmedium 1,01 g/L ($\pm 0,035 \text{ g/L}$). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. 69
- Abbildung 43: Auswirkungen der thermischen Degradation auf den Druck einer PDO-Teststruktur.** Eine identische Teststruktur wurde unter gleichen Bedingungen nach 30, 60, 90 und 120 min (von links nach rechts) konstanten Erhitzens des PDO auf 130 °C gedruckt. ... 115
- Abbildung 44: Relatives Fluoreszenzsignal der zur Analyse auf eine bakterielle Kontamination mittels qPCR aufgetragenen Proben des Zellkulturmediums nach siebentägiger Kultivierung im Bioreaktorsystem und Kontrollen.** Die Graphik stellt das relative Fluoreszenzsignal im ROX-Kanal (rot) und im FAM-Kanal (grün) dar. Die interne Kontrolle des qPCR-Kits zeigt ein steigendes, relatives Fluoreszenzsignal im ROX-Kanal an.

Ein verstärkt ansteigendes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal, welches auf eine bakterielle Kontamination hindeutet, kann nur für die Positivkontrolle gemessen werden.....	116
Abbildung 45: Ablauf der Scaffold-Herstellung für poröse PDO-Scaffolds durch Salzlaugung.	126
Abbildung 46: Poröses PDO-Scaffold für μCT-Analyse auf Probenhalter. Zur Analyse mittels μ CT wurde ein Scaffold mit einem Durchmesser von 17 mm auf dem Probenhalter platziert.....	130
Abbildung 47: Gußform (links) und 3D-Modell für Probekörper. Die Probekörper für die porösen PDO-Scaffolds werden mit einer Gußform nach Typ 1BA hergestellt (links). Die Probekörper für den 3D-Druck werden anhand eines 3D-Modells nach Typ 1BB hergestellt (rechts, Maßangaben in mm).....	132
Abbildung 48: Ablauf der Scaffold- Besiedelung.	135
Abbildung 49: Schematischer Aufbau des Bioreaktorsystems. Das Bioreaktorsystem besteht aus einem inneren (rot) und einen äußeren (orange) Kreislauf zur Versorgung der Gefäßprothese. An den inneren Kreislauf ist ein Drucksystem zur Erstellung eines Druckpulses angeschlossen. Ebenfalls ist eine Fließinjektionsanalyse an die Kreisläufe zur sterilen Entnahme und Analyse von Proben des Zellkulturmediums angeschlossen.	142
Abbildung 50: Aufgebautes Bioreaktorsystem.	143
Abbildung 51: Schematischer Aufbau der FIA (mit angeschlossenem Experiment zur Kultivierung von HUVECs auf Flowslides unter dynamischen Bedingungen). Die FIA besteht aus zwei Ventilen und einer Peristaltikpumpe. Über Ventil A wird entweder die Probe oder eine Puffer-Lösung zum Reinigen der Schläuche selektiert. Mit Ventil B wird diese Probe entweder in ein Abfall-Gefäß oder in den Probenbehälter geleitet.	144
Abbildung 52: An die Tüllen der zentralen Bioreaktorkammer angeschlossene Gefäß-Teststrukturen und zentrale Bioreaktorkammer. Zur Untersuchung der strömungsmechanischen Eigenschaften wurden verschiedene Teststrukturen in die zentrale Bioreaktorkammer (D) eingesetzt. A: Silikonschlauch (ID = 8 mm); B: 3D-gedruckte PLA-Röhre (ID = 8 mm); C: Dezellularisiertes Gefäß eines Schweins (ID ~ 8 mm).	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis aller verwendeten Abkürzungen.	XI
Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Einheiten.	XII
Tabelle 3: Berechnete Parameter für das Potenzgesetz-Modell. Auf Basis der gemessenen Viskositätswerte (Abbildung 30) für die verschiedenen EGM-2/MC-Lösungen wurden die Parameter für das Potenzgesetz-Modell berechnet.	55
Tabelle 4: Exemplarische Einstellungen zum Erreichen eines Scherstress von 5 dyn/cm² während der Kultivierung einer Gefäßprothese. Während der Kultivierung wird Zellkulturmedium mit einem MC-Anteil von 1% verwendet.	71
Tabelle 5: Verwendete Software.	119
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.	120
Tabelle 7: Verwendete Analyse-Kits.	122
Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.	122
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	122
Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Proteine und Farbstoffe.	123
Tabelle 11: Verwendete Zellsysteme.	124
Tabelle 12: Verwendete Zellkulturmedien.	124
Tabelle 13: Untersuchte Zellzahlverhältnisses aus MSCs und GFP-HUVECs für Scaffold-Besiedelung.	136
Tabelle 14: Untersuchte Gesamtzellzahl-Kombinationen aus MSCs und GFP-HUVECs für Scaffold-Besiedelung.	136
Tabelle 15: Konzentration der zugesetzten Wachstumsfaktoren je verwendetem Zellkulturmedium.	137
Tabelle 16: Parameter zur Erzeugung exemplarischer Druckpulse mittels Formel 4 (Abschnitt 8.3.6.7)	148

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Heene
Geburtsdatum	15.12.1989
Geburtsort	Hannover

Akademischer Werdegang

Seit 04/2017	Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
10/2014 – 03/2017	Masterstudium, M. Sc. im Fach Life Science, Leibniz Universität Hannover Thema der Masterarbeit: „Druckimplementierung und Simulierung in einem Gefäßbioreaktor“
10/2010 – 10/2014	Bachelorstudium, B. Sc. im Fach Life Science, Leibniz Universität Thema der Bachelorarbeit: „Immobilisierung von Lipasen auf Monolithen als Benchmark zu Tiefenfiltern“
2009	Abitur, Sophienschule Hannover

Berufliche Erfahrung

04/2017 – 09/2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
10/2015 – 12/2015	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
08/2011 – 02/2012	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
08/2013 – 03/2017	Studentische Aushilfe bei COMIX, Comicbuchhandlung GmbH & Co. KG
08/2009 – 04/2010	Zivildienst Kinderkrankenhaus auf der Bult, Ambulanz- und Aufnahmezentrum

Absolvierte Praktika

- 02/2015 – 03/2015 Forschungspraktikum in Israel an der Faculty for Biotechnology & Food Engineering des Technion, Haifa
- Forschungsthema: “Biosensing of low concentrated bacteria in liquids based on porous SiO₂-chips coated with Wheat Germ Agglutinin”

Fortbildungen und Auszeichnungen

- 07/2018 Teilnahme an einem Seminar mit dem Thema „Von der Idee zu Markt“
- 11/2017 Erhalt des Knubben-Technikpreis 2017 des VDI Bezirksverein Hannover e.V.
- 07/2015 Teilnahme an einem Fortbildungslehrgang zur „Genetechnischen Sicherheit“ nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV
- 07/2015 Teilnahme an einer Veranstaltung zu „Qualitäts- Öko- und Kostenmanagement in der chemisch-pharmazeutischen Industrie“ mit dem Ausbildungsziel „Qualitätsmanagement/GMP-Beauftragter“, VL-Nr. 15229, Prof. Dr. rer. nat. Robert Faurie
- 06/2015 Teilnahme an der Lehrveranstaltung „Betriebsbeauftragter für Gewässerschutz“
- 05/2015 Teilnahme an einem Seminar mit dem Thema „Qualitätsmanagement in der Biotechnologie“

Publikationsliste

Akzeptierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

Paul Maschhoff, Sebastian Heene, Antonina Lavrentieva, Thorleif Hentrop, Christian Leibold, Marc-Nils Wahalla, Nils Stanislawski, Holger Blume, Thomas Scheper, Cornelia Blume

Titel: An intelligent bioreactor system for the cultivation of a bioartificial vascular graft

Veröffentlicht am 28.12.2016 in Engineering in Life Sciences, Wiley, Anteil: 10%

doi.org/10.1002/elsc.201600138

Nils Stanislawski, Fabian Cholewa, Henrik Heymann, Xenia Kraus, Sebastian Heene, Martin Witt, Stefanie Thoms, Cornelia Blume, Holger Blume

Titel: Automated Bioreactor System for the Cultivation of Autologous Tissue-Engineered Vascular Grafts

Veröffentlicht in 07.2020 in Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE, Anteil: 10%

doi.org/10.1109/EMBC44109.2020.9175340

Heene, S., Thoms, S., Kalies, S., Wegner, N., Peppermüller, P., Born, N., Walther, F., Scheper, T., & Blume, C. A.

Titel: Vascular Network Formation on Macroporous Polydioxanone Scaffolds

Veröffentlicht am 24.02.2021 in Tissue Engineering - Part A., Mary Ann Liebert, Inc, Anteil: 80%

doi.org/10.1089/ten.TEA.2020.0232

Cornelia Blume, Xenia Kraus, Sebastian Loewner, Sebastian Heene, Holger Blume, Nils Stanislawski, Fabian Cholewa

Titel: Vascular Implants - new aspects for in situ tissue engineering

Eingereicht am 10.08.2021 bei Engineering in Life Sciences, Wiley, Anteil: 10%

doi.org/10.1002/elsc.202100100

Posterbeiträge

BioEngineering 2017: BioMEMS, 3D-BioPrinting & Synthetic Biology, Boston, 16.03.2017-17.03.2017

Christian Leibold, Rebecca Jonczyk, Sebastian Heene, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: A Bioreactor-System for Cultivation and Quality Control of 3D-printed Vascular Grafts

International Symposium of Biofabrication, Hannover, 31.08.2017-01.09.2017

Sebastian Heene, Christian Leibold, Cornelia Blume

Evaluation of shear stress inside a vascular graft bioreactor

3D Cell Culture, Freiburg, 05.06.2018-07.06.2018

Sebastian Heene, Stefanie Thoms, Xenia Kraus, Rebecca Jonczyk, Thomas Scheper, Cornelia Blume

Titel: Forming of tubular structures inside porous polydioxanone and PLLA/PLGA scaffolds

Annual Meeting of the int. Society for Biofabrication, Würzburg, 29.10.2018-31.10.2018

Sebastian Heene, Sebastian Loewner, Nils Stanislawski, Stefanie Thoms, Xenia Kraus, Rebecca Jonczyk, Thomas Scheper, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Vascular networks for 3D printed scaffolds or microporous scaffolds generated by porogen leaching

Vorträge auf internationalen Konferenzen

Advanced Biomedical Engineering and Instrumentation Summit, San Francisco, 03.06.2019-05.06.2019

Sebastian Heene, Stefanie Thoms, Xenia Kraus, Sebastian Loewner, Nils Leeker, Rebecca Jonczyk, Cornelia Blume, Nils Stanislawski, Fabian Cholewa, Holger Blume

Titel: A bioreactor system for the cultivation of a tissue engineered vascular graft