



**Entwicklung von Technologien zur Optimierung von Tissue Engineering
Prozessen am Beispiel der Herstellung von kardialem Gewebe**

Development of technologies to optimize tissue engineering processes,
documented on the example of the generation of cardiac tissue

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Fachbereich Biomedizin

vorgelegt von

Sebastian Schürlein

geboren in

Dinkelsbühl

angefertigt am

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg 2016

eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Engstler

Erstgutachter: Prof. Dr. Heike Walles

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Drittgutachter: Prof. Dr. Frank Edenhofer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Abstract	XI
1 Einleitung	1
1.1 Notwendigkeit des kardialen Tissue Engineerings.....	1
1.2 Das menschliche Herz	2
1.3 Tissue Engineering	2
1.3.1 Verschiedene Zellquellen.....	6
1.3.2 Extrazelluläre Matrix.....	8
1.3.3 Mögliche Matrices als Grundgerüst für das Tissue Engineering.....	10
1.4 Technische Komponenten für das Tissue Engineering	13
1.4.1 Elektrosponning-Anlage	13
1.4.2 Inkubatoren.....	16
1.5 Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.2 Geräte	19
2.3 Chemikalien.....	21
2.4 Antikörper	24
2.5 Lösungen	25
2.5.1 Dezellularisieren.....	25
2.5.2 Zellkultur	25
2.5.3 Histologische Lösungen.....	26
2.6 Medien	28
2.7 Methoden.....	28
2.7.1 Dezellularisierung von Geweben	29
2.7.2 Programmierung	31
2.7.3 Elektrosponning	32

2.7.4	Zellkultur	32
2.7.5	Histologie	38
2.7.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Dezellularisierung von Gewebe	44
3.1.1	Dezellularisierung von porzinem Darm (SISser).....	44
3.1.2	Dezellularisierungswand	45
3.1.3	Dezellularisierung von porzinem Herz	47
3.2	Elektrospinning	50
3.2.1	Elektrospinning-Apparatur.....	51
3.2.2	Generierung gerichteter Matrices	52
3.3	Inkubator	65
3.3.1	Aufbau	65
3.3.2	Steuerung	68
3.4	Reaktorplattform	70
3.4.1	Komponenten	70
3.4.2	Aufbau	82
3.4.3	Steuerung	84
3.4.4	Gewebekultur.....	86
3.5	Zellen für kardiales Tissue Engineering.....	89
3.5.1	Kardiosphären abgeleitete Zellen	90
3.5.2	Induzierte pluripotente Stammzellen	92
4	Diskussion.....	98
4.1	Mechanische Peripherie für das Tissue Engineering	98
4.1.1	Dezellularisierungswand	99
4.1.2	Inkubator	101
4.1.3	Bioreaktorplattform	102
4.2	Matrix für Tissue Engineering	104
4.2.1	Elektrogesponnene Matrix.....	105
4.2.2	Dezellularisierte, biologische Matrix.....	107
4.3	Generierung von kardialem Gewebe	109
4.3.1	Gewebe aus Kardiosphären abgeleiteten Zellen	110
4.3.2	Gewebe aus iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten	111

5	Ausblick	114
6	Literaturverzeichnis.....	116
	Anhang	124
	Lebenslauf.....	153
	Publikationsliste.....	155
	Eidesstattliche Erklärung	157
	Affidavit	157
	Danksagung	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Vacanti-Maus (11).....	3
Abbildung 2: Notwendige Komponenten für das Tissue Engineering.....	4
Abbildung 3: Schema Tissue Engineering.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Elektrospinning-Anlage	14
Abbildung 5: Schema Dezellularisierung Schweineherz.....	31
Abbildung 6: Einspannen der SISser in eine Zellkrone	38
Abbildung 7: Dezellularisierter porziner Darm (SISser).....	44
Abbildung 8: Dezellularisierungswand	46
Abbildung 9: Datenflussdiagramm der Dezellularisierungswand	47
Abbildung 10: Charakterisierung dezellularisiertes Schweineherz	49
Abbildung 11: Elektrospinningeinheit	51
Abbildung 12: Polycaprolacton-Matrizes gesponnen aus Hexafluorisopropanol.	54
Abbildung 13: Polycaprolacton-Matrizes gesponnen aus Chloroform.....	56
Abbildung 14: Kombinationsmatrix aus PCL und Gelatine.....	58
Abbildung 15: Kombinationsmatrix aus PCL und pulverisierter Herzmatrix	59
Abbildung 16: Zellen ausgesät auf PCL-Matrix, gesponnen aus HFP.....	61
Abbildung 17: Zellen ausgesät auf PCL-Matrix, gesponnen aus Chloroform.	62
Abbildung 18: Zellen ausgesät auf kombinierten Matrizes.....	63
Abbildung 19: Stand-Alone-Inkubatorsystem.	66
Abbildung 20: Schaltschrank Inkubator.	67
Abbildung 21: Datenflussdiagramm des Stand-Alone Inkubators	69
Abbildung 22: Wärmetauscher	71
Abbildung 23: Temperaturverteilung und Mediuermwärmung in Wärmetauscher.....	73
Abbildung 24: Erwärmungscharakteristik	74
Abbildung 25: Gasaustauscher	75
Abbildung 26: Schnittdarstellung Gasaustauscher.....	76
Abbildung 27: Pufferungspotential des Gasaustauschers.....	77

Abbildung 28: Beutelpumpe	78
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Prinzips der Beutelpumpe.....	79
Abbildung 30: Funktionsschema der Beutelpumpe.	80
Abbildung 31: Druckcharakteristik des Luftsystems.	80
Abbildung 32: Druckprofil des Mediumsystems und daraus resultierende Flussrate.....	81
Abbildung 33: Mediumkreislauf des Kultursystems.....	83
Abbildung 34: Schematische Darstellung des Kultursystems im Kreislauf.....	84
Abbildung 35: Datenflussdiagramm der Steuerung der Bioreaktorplattform	85
Abbildung 36: Histologie porziner Karotiden	87
Abbildung 37: Funktionalität der dynamisch kultivierten Karotide	89
Abbildung 38: H&E-Färbung unterschiedlicher CDC-Kulturen	91
Abbildung 39: Kardiosphären abgeleitete Zellen, differenziert mit 5-Azacidine	91
Abbildung 40: Kardiosphären abgeleitete Zellen differenziert mit Oxytocin.....	92
Abbildung 41: Morphologie der Mono-Kultur von iPS abgeleiteten Kardiomyozyten auf der SISser.....	94
Abbildung 42: Expression kardialer Marker der Mono-Kultur auf der SISser.	94
Abbildung 43: Morphologie der Co-Kultur von iPS abgeleiteten Kardiomyozyten, auf der SISser	96
Abbildung 44: Expression kardialer Marker der Co-Kultur auf der SISser.....	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller eingesetzten Materialien.....	18
Tabelle 2: Auflistung der eingesetzten Geräte	19
Tabelle 3: Auflistung der Chemikalien der verschiedenen Versuche	21
Tabelle 4: Auflistung aller eingesetzten Antikörper	25
Tabelle 5: Aussaatdichten verschiedener adhärenter Zellen	37
Tabelle 6: Dezellularisierungsgrad verschiedener Bereiche des Herzens	48
Tabelle 7: Überblick elektrogessponnene Matrices.....	53
Tabelle 8: Konfluenz und Ausrichtung der Zellen.....	64
Tabelle 9: Kultur von CDCs aud SISser unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	90

Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes Lipoprotein geringer Dichte (acetylated low density lipoprotein)
bFGF	grundlegender Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
CAD	Computerunterstütztes Design (Computer-aided design)
CD31	cluster of differentiation 31
CDC	Kardiosphären abgeleitete Zellen (cardiosphere derived cells)
CPU	Zentrale Verarbeitungseinheit (Central Processing Unit)
cTnC	kardiales Troponin C (cardiac Troponin C)
cTnT	kardiales Troponin T (cardiac Troponin T)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GMP	gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
H&E	Hämatoxilin & Eosin
HCl	Hydrogenchlorid
HFP	Hexafluorisopropanol
IMDM	Iscove's modifiziertes Eagle Medium
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
MSC	mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCL	Polycaprolactone
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGA	Polyglykolsäure (polyglycolic acid)
PLGA	Polyactid-co-Glycolid (polylactid-co-glycolid acid)

PLLA	Poly-L-Milchsäure (poly L lactic acid)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SISser	small intestinal submucosa mit Serosa
SOP	Standardarbeitsanweisung (standard operating procedure)
VE	voll entsalzt
α actinin	alpha Actinin
α SMA	alpha smooth muscle actin
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise der Herzinfarkt, sind die häufigste Todesursache weltweit (1). Bei einem Herzinfarkt sterben Areale des Herzens aufgrund einer Unterversorgung mit Blut ab. Da das Herzmuskelgewebe ein sogenanntes terminal differenziertes Gewebe ist, kommt es zu keiner Regeneration des Gewebes, mit der Folge einer Herzinsuffizienz beziehungsweise dem Tod des Patienten. Eine alternative Behandlungsmöglichkeit zu einer Herztransplantation stellt das Tissue Engineering dar. Mit Hilfe des Tissue Engineerings können dreidimensionale Gewebe aufgebaut und kultiviert werden, um auf diese Weise ein funktionelles Gewebe zu erhalten, durch welches das abgestorbene Gewebeareal des Herzens zukünftig auch ersetzt werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden notwendige Technologien für den Aufbau von Geweben entwickelt sowie erste Versuche für die Erzeugung eines funktionellen Herzmuskelgewebes durchgeführt. Beim Aufbau von dreidimensionalen Geweben finden Trägerstrukturen Anwendung, die mit Zellen besiedelt werden. Solche Trägerstrukturen können aus biologischen oder synthetischen Polymeren hergestellt sein oder aus der extrazellulären Matrix eines dezellularisierten Gewebes bestehen. Für eine standardisierte Dezellularisierung von Geweben wurde eine computergesteuerte Pumpeneinheit, für die Herstellung von Nanofaseraffolds eine Elektrospinninganlage entwickelt. Mit Hilfe der Dezellularisierungseinheit können komplexe Organe, wie ein Herz im Ganzen, reproduzierbar dezellularisiert werden. Untersuchungen der mittels Elektrospinning hergestellten Nanofaseraffolds, welche als Alternative zu der dezellularisierten, natürlichen Matrix eingesetzt werden können, zeigten bei allen hergestellten Zusammensetzungen eine Orientierung der Zellen entlang der Fasern.

Die Kultivierung von Zellmatrixkonstrukten erfolgt im Tissue Engineering häufig unter dynamischen Bedingungen. Hierfür wurde ein mobiler Stand-Alone-Inkubator mit der erforderlichen Peripherie für eine Kultur unter Perfusion des Gewebes entwickelt. Als Weiterentwicklung des Stand-Alone-Inkubators ist eine modulare Bioreaktorplattform, bestehend aus Wärmetauscher, Beutelpumpe und Gasaustauscher, aufgebaut worden. In dieses System kann über Standard-Anschlüsse jegliche Art von Bioreaktor in das System eingebunden werden. Durch die Kompaktheit des Systems ist es möglich mehrere Ansätze parallel auf engem Raum durchzuführen. Die Funktion der Plattform, wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Gewebekultur einer nativen porcinen Karotis nachgewiesen.

Für den Aufbau des kardialen Gewebes dient die small intestinal submucosa ohne Serosa (SISser) als Trägerstruktur. Der Aufbau des Gewebekonstrukts erfolgte in verschiedenen Ansätzen unter Einsatz verschiedener Zellarten. Native, aus Herzbiopsien generierte Cardiosphere derived cells (CDCs) verteilten sich gleichmäßig über die Oberfläche der Matrix, jedoch konnten immunhistologisch keine spezifischen kardialen Marker bei den artifiziellen Geweben nachgewiesen werden. Zellmatrixkonstrukte aus einer

Mono-Kultur von Kardiomyozyten, differenziert aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) sowie einer Co-Kultur dieser Kardiomyozyten mit mesenchymalen Stammzellen und Zellen aus einer Herzbiopsie zeigten nach wenigen Tagen in Kultur ein kontraktiles Verhalten. Immunhistologische Färbungen der beiden Gewebe bestätigten die Expression der spezifischen kardialen Marker, wie beispielsweise kardiales Troponin T, kardiales Troponin C und alpha Actinin. Die Kardiomyozyten der Mono-Kultur sind jedoch nicht über die gesamte Matrixoberfläche verteilt, sondern bilden Aggregate. Bei der Co-Kultur kann eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Matrix beobachtet werden. Der vielversprechendste Ansatz für den Aufbau eines Herzmuskelgewebes, welches als Implantat oder Testsystem eingesetzt werden kann, bildet nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, ein Konstrukt aus der SISser und der Co-Kultur der Zellen. Allerdings muss die Zusammensetzung der Co-Kultur sowie das Verhältnis der Zellzahlen optimiert werden.

Abstract

Cardiovascular diseases as myocardial infarction are the most frequent cause of death worldwide (1). During a myocardial infarction, areas of the heart are being damaged because of an insufficient nutrient supply. Heart tissue is a terminal differentiated tissue, this means that it can't be regenerated by itself. The consequence of this characteristic is a heart insufficiency or the death of the patient. An alternative treatment to heart transplantation is promised by tissue engineering. By using the methods of tissue engineering, cells can be cultured on a scaffold to generate a mature tissue, which can be used to replace the damaged areas of the heart.

In the present work systems for the generation of tissues have been developed and first experiments to build up a functional cardiac patch were performed. To generate three-dimensional tissues, scaffolds colonized with cells are necessary. These scaffolds can be produced with biological or synthetic polymers or even decellularized tissues can be used. A computer-controlled decellularization platform was designed to ensure a standardized, reproducible decellularization of complex organs like hearts. Furthermore, an electrospinning device was developed for the production of nanofiber scaffolds. On such matrices, seeded cells grow along the fibers.

Most cell-matrix-constructs are cultured under dynamic conditions in tissue engineering. A stand-alone-incubator system containing the required periphery to apply different culture conditions was developed. As further development a compact modular bioreactor platform consisting of a heat exchanger, a bag pump and a gas exchanger was established. All kinds of bioreactors can be enclosed to the system via standard Luer-Lock-Connectors. Due to the compactness of the system, it is possible to parallelize and run experiments easily on narrow space. The functionality of the platform was demonstrated by a tissue culture of a native porcine carotid artery.

The small intestinal submucosa without serosa (SISser) was employed as matrix for the development of a functional cardiac patch. In different experiments diverse cell types were used to generate a cardiac construct. Cardiosphere derived cells (CDC) seeded on the SISser showed an equal distribution all over the surface of the matrix, but no expression of specific cardiac markers. Constructs consisting of a mono-culture of induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (CM-iPS cells) or a co-culture of CM-iPS cells, mesenchymal stem cells and cells isolated from a heart biopsy showed a contraction of the whole matrix after a few days in culture. Furthermore, cardiac markers like cardiac troponin T, cardiac troponin C and alpha actinin could be observed by immunohistological staining. Regarding the morphology of the different tissues, the mono-culture of the CM-iPS cells formed agglomerates on the surface of the matrix whereas the co-culture showed a well distribution of the cells all over the surface of the matrix. Consequently, the co-culture on the SISser is the most promising approach for the

development of a functional cardiac patch. However, the combination of cell types within the co-culture and their ratio has to be optimized.

1 Einleitung

1.1 Notwendigkeit des kardialen Tissue Engineerings

Durch den mit der Industrialisierung verbundenen Anstieg der Lebensqualität und des Lebensalters entwickelten sich im Laufe der vergangenen Jahrzehnte verschiedene Krankheiten. Diese Krankheiten werden vorwiegend durch den Lebensstil hervorgerufen. Dabei spielen die Ernährung, der Konsum von Genussmitteln und Umweltfaktoren, wie beispielsweise Stress eine große Rolle. Eine erhöhte Aufnahme von Fett, Zucker, Tabak oder Alkohol kann zu einer Fehlfunktion oder Schädigung von lebenswichtigen Organen, wie der Leber, des Pankreas oder des Herzens (2, 3) führen. Aus diesen Gründen, und auch bedingt durch genetische Defekte, wird der Bedarf an Organtransplantationen von Patienten unterschiedlichen Alters immer höher.

Betrachtet man nur den Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen stellt man fest, dass diese Erkrankungen, wie zum Beispiel Herzinfarkt, nicht nur die häufigste Todesursache in Europa (4) sind, sondern auch weltweit (1, 4). Das zentrale Organ des kardiovaskulären Systems ist das Herz. Eine Schädigung des Herzens bedingt eine medizinische Behandlung. Der Hauptgrund dafür ist, dass der Herzmuskel ein terminal differenziertes Gewebe ist, was bedeutet, dass die Kardiomyozyten, die für die Pumpfunktion des Herzens verantwortlich sind, nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen und somit keine eigeninduzierte Reparatur des Gewebes möglich ist. Dadurch kann der Teil des Herzens, der durch einen Myokardinfarkt geschädigt ist, nicht mehr wiederhergestellt oder gleichwertig ersetzt werden. Der Verlust von Arealen des Herzmuskels führt zu einer Herzinsuffizienz des Patienten, letztendlich auch zum Tod. Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten bei schweren Schädigungen des Herzmuskelgewebes, ungeachtet der zugrundeliegenden Ursachen, sind stark limitiert. Für eine Heilung des Patienten ist eine Herztransplantation häufig die einzige Möglichkeit (5). Jedoch kann der Bedarf an funktionellen Organen nicht durch die Anzahl an Spendern gedeckt werden. Des Weiteren stellen die Abstoßungsreaktionen des eigenen Körpers ein großes Problem bei Organtransplantationen dar (6, 7). Der Körper von Vertebraten reagiert mit einer Immunantwort auf körperfremde Substanzen, versucht mit dieser Abwehrreaktion diese abzutöten und aus dem Körper auszuschleusen. In der modernen Medizin kommen daher nach Organtransplantationen Immunsuppressiva zur Unterdrückung der Immunantwort des Organempfängers zum Einsatz. Durch diese Behandlung ergibt sich für den Patienten die Gefahr an Infektionskrankheiten zu erkranken, welche durch die Immunsuppression nicht mehr durch den eigenen Körper bekämpft werden können. Möglichkeiten um diese Probleme zu lösen, bietet das Tissue Engineering. Im Tissue Engineering können körpereigene Zellen für den Aufbau von Geweben eingesetzt

werden. Das Immunsystem erkennt diese Gewebe nicht als körperfremd, somit kommt es nicht zu einer Immunantwort und es kann auf den Einsatz von Immunsuppressiva verzichtet werden (8).

1.2 Das menschliche Herz

Als zentrales Organ des menschlichen kardiovaskulären Systems hat das Herz die Aufgabe den Körper mit sauerstoffreichem Blut zu versorgen. Damit dies möglich ist, hat das Herz einen speziellen Aufbau. Es besteht aus vier Hohlräumen, zwei Kammern und zwei Vorhöfen (9), welche von dem Herzmuskelgewebe umgeben sind (10). Die Vorhöfe sind durch ein Vorhofseptum, die Kammern durch ein Kammerseptum voneinander getrennt, so dass das Herz in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt werden kann. Eine dauerhafte Versorgung des Körpers mit sauerstoffreichem Blut ist dadurch gewährleistet, dass die beiden Herzhälften in Reihe geschaltet sind. Aus der Hohlvene gelangt sauerstoffarmes Blut über den rechten Vorhof in die rechte Kammer. Von dort wird das Blut über die Pulmonalarterie in den Lungenkreislauf gepumpt. Das in der Lunge mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt über den linken Vorhof in die linke Herzkammer. Diese befördert das Blut zur Versorgung der Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff in den Körperkreislauf. Da die linke Herzkammer einen höheren Druck aufbringen muss um das Blut weiter zu pumpen, ist der linke Herzmuskel wesentlich stärker ausgebildet als der rechte (10).

Die Versorgung des Herzmuskelgewebes mit Nährstoffen und sauerstoffreichem Blut erfolgt über die linke sowie die rechte Herzkranzarterie und deren Äste (9). Sind diese Gefäße stark verengt beziehungsweise verschlossen, zum Beispiel durch einen Thrombus, so kommt es in den betroffenen Arealen zu einer Unterversorgung des Herzmuskels. Hält die Unterversorgung länger als 20 Minuten an, tritt die Schädigung des Herzmuskels aufgrund von Nekrose der Herzmuskelzellen ein, was zu einem Herzinfarkt und dem Funktionsverlust des betroffenen Areals führt (10). Dieser Funktionsverlust kann eine verminderte Pumpleistung des Herzens zur Folge haben und somit zu einer Herzinsuffizienz führen. Da sich das Herzgewebe nicht gleichwertig regeneriert, liegen große Hoffnungen zur Behandlung eines Herzinfarktes im Tissue Engineering.

1.3 Tissue Engineering

Tissue Engineering entstand Mitte der 80iger Jahre als Dr. Joseph Vacanti und Dr. Robert Langer die Idee hatten biokompatible und biologisch abbaubare Trägerstrukturen zu entwickeln, die mit Zellen besiedelt werden können, um sie Patienten zu implantieren. Von diesem Zeitpunkt an verbreitete sich die Idee des Tissue Engineerings über die ganze Welt. In das öffentliche Bewusstsein trat das Tissue Engineering im

Jahr 1997 durch eine Sendung des BBC, welche eine Maus zeigte, auf deren Rücken ein mit Zellen besiedeltes Kollagengerüst in der Form eines menschlichen Ohres implantiert war (11).



Abbildung 1: Die Vacanti-Maus (11)

Die Maus wurde als Bioreaktor zum Züchten einer Knorpelstruktur in der Form einer Ohrmuschel eingesetzt. Sie stellt die physiologischen Bedingungen zur Reifung der Chondrozyten. Dazu wurde das Knorpelgerüst unter die Haut der Maus transplantiert.

Mit Hilfe dieses Beispiels konnte gezeigt werden, dass es möglich ist eine biokompatible Trägerstruktur mit Zellen zu besiedeln und diese am Leben zu erhalten. Bereits im Jahre 1991 wurde dem ersten menschlichen Patienten ein Produkt des Tissue Engineerings implantiert. Der Patient litt am Poland-Syndrom, was eine Fehlbildung des Brustkorbes und ein Fehlen des Sternums zur Folge hatte. Ihm wurde daher ein mit autologen Chondrozyten besiedeltes Konstrukt aus synthetischem Polymer als Ersatz für das fehlende Sternum implantiert (11). Mit der Transplantation von Geweben welche aus autologen Zellen generiert wurden, können die Abstoßungsreaktionen des Immunsystems des Patienten verhindert werden.

Das Ziel des Tissue Engineerings ist es, funktionelle Gewebe als Implantate für Patienten herzustellen. Da sich Gewebe wie zum Beispiel das Herz und der Pankreas nicht selbst regenerieren können, ist für eine Heilung des Patienten ein Spenderorgan nötig. Allerdings ist für solche Organe die Anzahl an Spendern limitiert und es ist nicht möglich alle Patienten mit einem Spenderorgan zu behandeln (12). Die Limitierung an Spenderorganen wurde zuerst versucht durch den Einsatz von Xenotransplantaten zu beheben. Zu diesem Zweck werden Tiere gezüchtet, deren Organe keine Abstoßungsreaktionen im menschlichen Körper auslösen (13). Diese Methode brachte bisher jedoch nicht den erhofften Erfolg und der Fokus für Transplantate wurde auf autologe Gewebe gelegt. Zuerst lag der Schwerpunkt für autologe Transplantate auf Geweben mit weniger komplexem Aufbau wie der Haut und des Knorpels (11).

Aufgrund der erreichten Erfolge bei dem Aufbau dieser Gewebe erweiterte sich das Anwendungsgebiet des Tissue Engineerings auf weitere Organe. Die entwickelten Implantate sollen zur Behandlung von geschädigten Organen, aber auch als Organersatz angewandt werden (14, 15). Das Herz stellt, da es sich bei diesem Gewebe um ein sogenanntes terminal differenziertes Gewebe handelt und wegen des komplexen Aufbaus des Organs, eine große Herausforderung dar. Daher werden für dieses Organ derzeit hauptsächlich funktionelle Gewebestücke aufgebaut, um die Folgen eines Herzinfarktes zu behandeln (16). Eine weitere Anwendung des artifiziiellen Gewebes ist die Entwicklung von humanen Testsystemen (17). Solche Testsysteme sind funktionelle Gewebe, die für verschiedenste Studie, wie Toxizitätsstudien eingesetzt werden können. Mit der Hilfe dieser Testsysteme kann die Anzahl an Tierversuchen in der Pharma- und Kosmetikindustrie reduziert werden (18). Des Weiteren ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse, welche durch die humanen Testsysteme generiert werden, wesentlich besser auf den Menschen übertragbar, als dies bei Tierversuchen möglich ist (19). Toxizitätsstudien von Arzneimitteln, welche mit diesen Systemen durchgeführt werden, haben im Vergleich zu Tierversuchen eine höhere Aussagekraft. Ebenso versprechen sie eine bessere Identifikation von Wirkstoffen bei der Arzneimittelentwicklung.

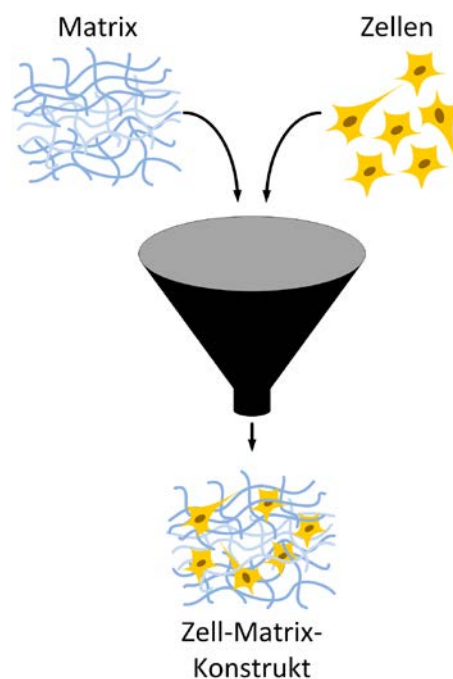


Abbildung 2: Notwendige Komponenten für das Tissue Engineering.

Zur Herstellung von Tissue Engineering Produkten benötigt man eine Trägerstruktur (Matrix oder Scaffold) und Zellen. Die Matrix wird mit den Zellen besiedelt und bei 37 °C, einem Gehalt von 5 % CO₂ der umgebenden Atmosphäre und einer Luftfeuchte von 95 % kultiviert bis sich ein stabiles Zell-Matrix-Konstrukt gebildet hat.

Für das Tissue Engineering werden zwei Hauptkomponenten benötigt, um ein Konstrukt herzustellen: (I) eine biokompatible Trägerstruktur (Scaffold) und (II) geeigneten Zellen, wie zum Beispiel differenzierte Stammzellen oder isolierte, gewebespezifische primäre Zelltypen (Abbildung 2). Die für das Zielgewebe geeigneten Zellen, welche die erforderlichen Aufgaben ausführen, werden meist aus einer Biopsie der Körperregion, in der sie vorkommen mittels unterschiedlicher Techniken isoliert. Durch den Einsatz verschiedenster Zellkulturtechniken werden die isolierten Zellen in Zellkulturgefäßen und Standardinkubatoren expandiert. Nach dem Expandieren werden die Zellen auf eine dreidimensionale Matrix ausgesät (20). Unter Einsatz von Wachstumsfaktoren, mechanischer beziehungsweise elektrischer Stimulation oder verschiedenen Kombinationen dieser drei Stimuli können die Zellen verschiedenen Reizen ausgesetzt werden, welche zu einer Reifung des Gewebes führen. Die Reifung des Gewebes erfolgt häufig in einem Bioreaktor (21). Das reife Gewebe kann im Anschluss an die Kultur im Bioreaktor als Implantat wieder in den Körper eingebracht werden oder als Testsystem für Substanzen der Pharmaindustrie zum Einsatz kommen (Abbildung 3). Da neben Trägerstrukturen auch die Bioreaktortechnologie bei der Kultur des Gewebes zum Einsatz kommt ist das Tissue Engineering ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches die Ingenieurs-, Material- und Lebenswissenschaft einschließt.

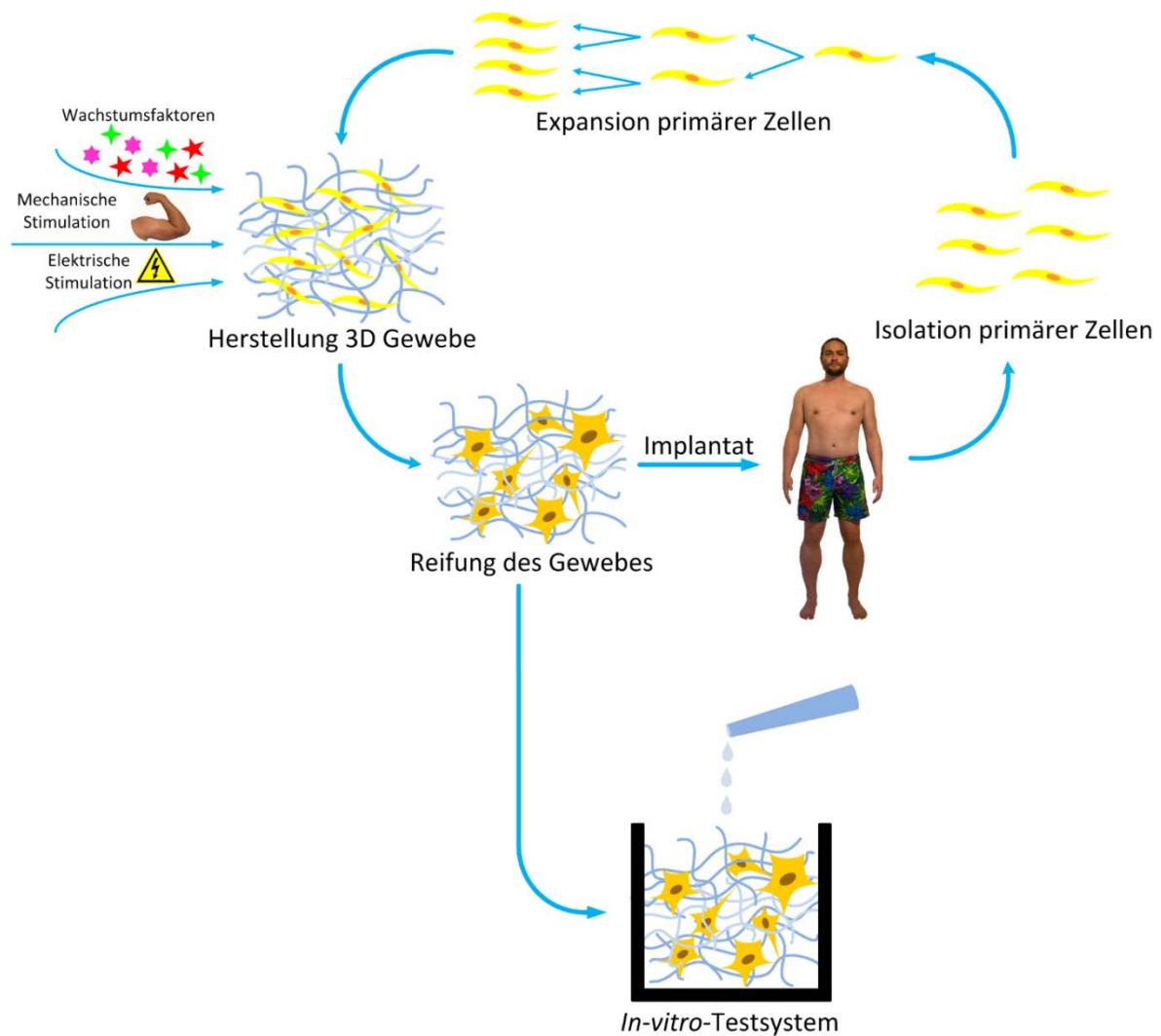


Abbildung 3: Schema Tissue Engineering

Aus dem Körper wird eine Biopsie, welche den gewünschten Zelltyp enthält, entnommen und die gewünschten Zellen daraus isoliert. Die isolierten Zellen werden anschließend mit den spezifischen Zellkulturtechniken expandiert, bis eine ausreichende Anzahl an Zellen vorhanden ist. Nach der Expansion werden die Zellen auf eine Trägerstruktur ausgesät und können auf dieser mit unterschiedlichen Reizen wie mechanischer oder elektrischer Stimulation beziehungsweise mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Im Anschluss an die Herstellung des dreidimensionalen Gewebes erfolgt eine Reifung des Gewebes *in vitro*. Sobald diese abgeschlossen ist kann das Gewebe als Implantat wieder in den Körper eingebracht oder als Testsystem für Wirkstoffe herangezogen werden.

1.3.1 Verschiedene Zellquellen

Es gibt unterschiedliche Zellquellen, die für das Tissue Engineering eingesetzt werden. Eine Möglichkeit ist es, aus den Geweben, die man aufbauen möchte, adulte Zellen aus Biopsien zu isolieren, um diese zu vermehren. Da diese Zellen schon aus dem gleichen Gewebeverbund, wie das Zielgewebe stammen,

geht man davon aus, dass diese Zellen die gleichen Aufgaben, die sie vor ihrer Isolation ausgeführt haben, auch im neuen Gewebe wieder übernehmen (22). Dies ist ein Vorteil der primären adulten Zellen, allerdings ist zur Isolation der spezifischen primären adulten Zellen die Entnahme einer Biopsie des entsprechenden Gewebes notwendig. Je nachdem von welchem Organ die Biopsie genommen werden muss, kann es sein, dass die Größe des Biopsiematerials nicht ausreicht, um die erforderliche Anzahl an Zellen zu isolieren. Ein Beispiel dafür ist das Herz, aus welchem nur sehr kleine Biopsien entnommen werden können, ohne die Funktion des Organs zu beeinträchtigen. Des Weiteren ist die Proliferationsfähigkeit von primären adulten Zellen begrenzt. So können sie häufig nur wenige Passagen (<5) in Kultur gehalten werden, bevor sie ihre Morphologie und Eigenschaften ändern. Eine Alternative sind Stammzellen, um den Mangel an spezifischen Geweben für die Zellisolation zu lösen (23). Diese Zellen können aus dem Blut (24), Fettgewebe (25) oder Knochenmark (26) isoliert und in einige Zellarten differenziert werden (27). Ein vielversprechender Ansatz für eine nahezu unbegrenzte Zellquelle sind die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) (28). Die iPS-Zellen lassen sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Ebenso können sie für deutlich mehr Passagen in Kultur gehalten werden als adulte Zellen.

1.3.1.1 Kardiosphären abgeleitete Zellen

Bei den „Kardiosphären abgeleiteten Zellen“ (engl. cardiosphere derived cells (CDCs)) handelt es sich um eine Zellquelle von adulten Zellen. Sie können aus Biopsien vom Atrium oder dem Endomyokard des humanen Herzens generiert werden (29). CDCs entstehen aus Zellen, welche aus den Biopsien des humanen Herzens auswachsen und sich selbstständig zu Kardiosphären zusammenlagern. Diese Zellen der Kardiosphären exprimieren c-Kit, CD105, Ki67, sowie Connexin 43 (30). In den Sphären entwickeln die CDCs Eigenschaften von Stammzellen (31). CDCs sind jedoch nicht der einzige Zelltyp, der in den Kardiosphären enthalten ist. Ebenfalls findet man in den Sphären vaskuläre Zellen, differenzierende Vorläuferzellen und spontan differenzierte Kardiomyozyten (32). Die CDCs sind des Weiteren positiv für die Marker α -sarcomeric actin, Connexin 43 und nach weiterer Expansion von zwei Passagen ebenso für CD105, c-Kit, CD90, CD34 und CD31. Ebenfalls sind sie negativ für die Marker MDR1, CD133, CD45, was die CDCs phänotypisch von humanen kardialen Stammzellen, endothelialen Stammzellvorläufern sowie von Stammzellvorläufern aus dem Knochenmark abgrenzt (30).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind die CDCs eine interessante Zellquelle für das Tissue Engineering. Allerdings kann bei diesen Zellen keine spontane Kontraktion während der Kultur induziert werden. Dies ist bisher nur bei der Co-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten aus der Ratte gelungen (32).

Da es sich bei diesen Zellen um Zellen handelt, die aus einer Herzbiopsie isoliert werden, sind sie nicht in unbegrenzter Anzahl verfügbar.

1.3.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Einen Weg, die Limitation begrenzt verfügbarer Zellquellen zu umgehen, bietet die Arbeit von Takahashi und Yamanaka. Im Jahr 2006 führten Takahashi und Yamanaka zum ersten Mal die Umwandlung von murinen Fibroblasten in Zellen mit Charakteristika, von embryonalen Stammzellen durch (33). Die entstandenen pluripotenten Stammzellen werden als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit in die Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren (34). Für diese Neuprogrammierung der Zellen verwendeten Takahashi und Yamanaka die vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc. Die beiden Forscher brachten diese Faktoren mittels viraler Transduktion in die Fibroblasten ein (33). Ein Jahr später führten Takahashi und Yamanaka mit der gleichen Methode erfolgreich eine Neuprogrammierung von humanen Fibroblasten der Haut durch (35). Im Laufe der Jahre wurden viele verschiedene Methoden für die Neuprogrammierung von Zellen durch Transkriptionsfaktoren oder sogenannten „small molecules“ beziehungsweise einer Kombination aus beiden veröffentlicht (33). Die derzeit am häufigsten eingesetzte Methode zur Herstellung von iPS-Zellen ist der Gentransfer mittels eines viralen Vektorsystems. Meist werden dafür Retroviren, Lentiviren, Adenoviren oder Plasmide eingesetzt. Mit dieser Methode kann aus jeder somatischen Zelle eine iPS-Zelle hergestellt werden (36). Dadurch und aufgrund der Tatsache, dass die iPS-Zellen in alle drei Keimblätter differenziert werden können, stellen sie eine sehr vielversprechende Zellquelle für das Tissue Engineering dar. Die iPS-Zellen sind für das Tissue Engineering in den Fokus gerückt, da mit ihnen Gewebe aufgebaut werden können, die sich nicht selbst regenerieren können beziehungsweise für die keine nativen Zellen isoliert werden können. Eines dieser Gewebe ist das Herzmuskelgewebe, da sich die Kardiomyozyten nicht mehr teilen und bisher auch keine Kardiomyozyten aus Biopsien des humanen Herzens isoliert sowie in Kultur gehalten werden können. In den letzten Jahren wurden einige Protokolle zur Differenzierung der iPS-Zellen in Kardiomyozyten entwickelt. Vom Differenzierungspotential entsprechen die iPS-Zellen den embryonalen Stammzellen, sind jedoch ethisch unbedenklich.

1.3.2 Extrazelluläre Matrix

Das menschliche Gewebe besteht nicht nur aus Zellen, sondern auch aus einem Netzwerk von Makromolekülen, der extrazellulären Matrix, in welche die Zellen eingebettet sind. Diese Makromoleküle sind in den verschiedenen Spezies weitestgehend gleich aufgebaut. Jedoch bewirken

unterschiedliche Zusammensetzungen der Makromoleküle eine Vielzahl an Geweben und körpereigenen Materialien. Je nach Anforderung an das Gewebe hat dieses eine charakteristische Zusammensetzung an Makromolekülen (37). Abhängig von ihrer Zusammensetzung hat die extrazelluläre Matrix verschiedene biomechanische Eigenschaften, die von weich bis starr und steif reichen (38). So kann die Matrix kalzifizieren und hart werden, wie zum Beispiel bei Knochen und Zähnen. Sie kann jedoch auch eine weiche Charakteristik behalten und transparent sein, wie bei der Cornea oder seilartige Strukturen ausbilden für Bänder (37). Durch die verschiedenen Eigenschaften der extrazellulären Matrix wirkt sich diese auf die Funktion des Gewebes (38), das Verhalten der Zellen, sowie der Differenzierung der Zellen aus (37, 38). Die extrazelluläre Matrix ist nicht nur für Eigenschaften der Gewebe verantwortlich, sondern gibt den Geweben und Organen auch ihre Struktur (39). Trotz der stabilen äußeren Erscheinung der Organe und Gewebe ist die extrazelluläre Matrix eine dynamische Struktur, was bedeutet, dass fortwährend umgebaut, abgebaut oder auf andere Art und Weise modifiziert wird (38). Verantwortlich für diese Modellierungsvorgänge der extrazellulären Matrix sind die sich in der Matrix befindenden Fibroblasten beziehungsweise Zellen der Fibroblastenfamilie. Sie synthetisieren die Makromoleküle und richten sie in der Matrix aus (37).

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus 3 Hauptgruppen von Makromolekülen, den Kollagenen, den Proteoglykanen und den Glykoproteinen zusammen (37, 38). Damit die Organe und Gewebe ihre Festigkeit und Struktur behalten, sind die Kollagenfasern, welche von den Fibroblasten gebildet und ausgerichtet werden, verantwortlich (40). Diese Kollagenfasern haben trotz gleicher Zusammensetzung verschiedene Anordnungen in den unterschiedlichen Gewebearten (37). Zwischen den Kollagenfasern sind die Proteoglykane eingelagert und füllen dadurch die Lücken in der Matrix auf. Die Proteoglykane können verschiedene Substanzen binden, beziehungsweise speichern und wieder abgeben, wie zum Beispiel zweiwertige Kationen und Wasser. Durch die Aufnahme und Abgabe von Wasser nehmen die Proteoglykane eine stoßdämpfende sowie eine schmierende Funktion ein (40). Ebenso bilden sie ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und können somit Gradienten im Gewebe aufbauen (38, 39), welche die Zellen im Gewebe stimuliert. Damit die Zellen nicht aus dem Gewebe ausgespült werden können, sind die Glykoproteine in der extrazellulären Matrix verantwortlich. Sie sind für die Adhäsion der Zellen in der Matrix und für die Signalübertragung zwischen den Zellen zuständig (40). Jede dieser Komponenten der extrazellulären Matrix hat je nach Gewebeart ein gewebespezifisches Expressionsmuster (41), was wie bereits oben erwähnt, zu den verschiedenen Eigenschaften der Gewebe führt.

Durch die extrazelluläre Matrix sind die Zellen in eine sehr komplizierte Matrix eingebettet, die die Zellen nicht nur zusammenhält, sondern auch deren Überleben, Entwicklung, Form, Polarität und Migrationsverhalten beeinflusst (37).

1.3.3 Mögliche Matrices als Grundgerüst für das Tissue Engineering

Die extrazelluläre Matrix bildet die Grundlage für jedes Konstrukt, das durch Tissue Engineering erzeugt werden soll. Je nach Art des Gewebes fallen der Matrix besondere Eigenschaften zu, die diese erfüllen muss. So werden für unterschiedliche Gewebe Matrices aus unterschiedlichen Materialien benötigt (42). Entsprechend der Anforderungen an die Matrix kann eine biologische Matrix eingesetzt werden oder es muss eine synthetische Matrix geschaffen werden.

1.3.3.1 Biologische Matrices

Biologische Matrices werden aus Lebewesen gewonnen. Dazu werden Organe beziehungsweise Stücke von Organen explantiert und die Zellen aus dem Gewebe ausgelöst, was als Dezellularisierung bezeichnet wird. Zur Matrixgewinnung wird auf tierisches Gewebe zurückgegriffen, da Komponenten der extrazellulären Matrix spezies-übergreifend hoch konserviert sind und es somit zu keinen Abstoßungsreaktionen kommt (43, 44). Des Weiteren können auch Matrices, welche nicht aus der Körperregion des Zielgewebes stammen für den Aufbau des Gewebes eingesetzt werden. Damit die Zellen aus dem entnommenen Gewebe oder Organ entfernt werden können, werden diese dynamisch oder statisch mit einer Dezellularisierungslösung inkubiert. Am Ende dieses Prozesses bleibt die zellfreie Matrix mit ihren spezifischen Strukturen zurück und kann mit humanen Zellen wiederbesiedelt werden. Im Laufe der Zeit wurden viele spezifische Protokolle für die Dezellularisierung verschiedenster Organe und Gewebe wie zum Beispiel Herz, Leber, Niere, Trachea, Plazenta, Muskel oder Darm entwickelt (45). Der Vorteil einer zellfreien Matrix, die dem Gewebe entspricht, welches damit behandelt werden soll, liegt darin, dass die spezifischen Zellen bzw. Stammzellen, die darauf ausgesät werden eine gewebecharakteristische Umgebung vorfinden, da die Anordnung der Fasern und der Moleküle der extrazellulären Matrix bereits der des aufzubauenden Gewebes entspricht. Diese Mikroumgebung unterstützt einen gewebespezifischen Regenerationsverlauf des Gewebes (15, 46). Im Vergleich zu einzelnen Komponenten der extrazellulären Matrix besitzt ein intaktes, dezellularisiertes Scaffold ein höheres Potential für das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellarten (47), da es ein großes Reservoir an biophysikalischen Reizen und Signalmolekülen beinhaltet (48).

Das Verhalten der dezellularisierten Gewebe im Körper muss vor deren Einsatz als Implantat untersucht werden. Daher wurden viele präklinische Studien im Tiermodell durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Matrizes *in vivo* die Neubildung des zu ersetzenden Gewebes positiv beeinflussen und fördern (49-51). Da die Ergebnisse in den präklinischen Studien sehr vielversprechend ausfielen, wurden die Konstrukte auch bereits für klinische Anwendungen eingesetzt (52).

Alle diese Matrizes können für das Tissue Engineering von Gewebe eingesetzt werden. Mittlerweile gibt es einige zellfreie Präparate, wie zum Beispiel dezellularisierte Knochen der Firma Tutogen kommerziell zu erwerben. In einigen Fällen, wie dem Tissue Engineering von Knochen, haben die biologischen Scaffolds, gewonnen aus Stücken von Organen, jedoch nicht die nötige Stabilität bzw. Steifigkeit. Daher muss in diesen Bereichen auf künstlich hergestellte Trägerstrukturen zurückgegriffen werden. Ebenfalls kann es sein, dass die biologische Matrix nach dem Dezellularisierungsprozess nicht die erforderlichen physikalischen Eigenschaften aufweist oder eine komplett andere Faserorientierung der Matrix gewünscht ist. Deshalb werden häufig auch definiert hergestellte Trägerstrukturen aus natürlichen bzw. künstlichen Polymeren eingesetzt.

1.3.3.2 Dezellularisierung von Geweben

Zur Durchführung eines Dezellularisierungsprozesses können verschiedenste Arten von Aufbauten eingesetzt werden. Einige Gewebe können dezellularisiert werden, indem man diese in eine Dezellularisierungslösung einlegt und schüttelt (52). Bei großen, komplexen Gewebe ist diese Methode nicht ausreichend, vor allem, wenn sie ihre ursprüngliche Form behalten sollen. Für die Dezellularisierung kompletter Organe werden diese häufig mit der Dezellularisierungslösung durchspült. Die einfachste Methode dies zu erreichen ist eine Reservoirflasche mit der Dezellularisierungslösung über dem Gewebe zu platzieren und die Lösung so durch das Gewebe laufen zu lassen (53). Der Nachteil an dieser Methode ist jedoch, dass man die Reservoirflasche permanent wieder befüllen und der Prozess deshalb ständig überwacht werden muss. Eine anwenderfreundlichere Methode ist die Nutzung einer Pumpe welche druckgeregelt ist. Bei einem solchen Aufbau kann ein Solldruck mit dem das Gewebe durchspült werden soll, eingegeben werden. Die Dezellularisierungslösung wird dann kontinuierlich mit gleichbleibendem Druck durch das Gewebe gepumpt. Eine manuelle Überwachung der Druckbedingungen ist somit nicht nötig (54).

1.3.3.3 Synthetische Trägerstrukturen

Nicht für alle Gewebe, die mittels Tissue Engineering hergestellt werden sollen, kann eine natürliche Matrix als Trägerstruktur eingesetzt werden. Dies kann sowohl an ihren physikalischen als auch an ihren

biologischen Eigenschaften liegen. Damit als Grundlage für den Aufbau eines Gewebes eine Matrix mit den nötigen physikalischen und biologischen Eigenschaften zur Verfügung steht, greift man auf synthetische Matrizes zurück. Diese Gerüststrukturen werden je nach Anwendungsfeld nicht nur aus biologischen, sondern auch aus synthetischen Polymeren hergestellt (55). Die künstlich hergestellten Scaffolds sollen so genau wie möglich die native extrazelluläre Matrix des Gewebes imitieren. Sogenannte Weichteilgewebe bestehen hauptsächlich aus Kollagen, Proteoglykan und Glykosaminoglykanen (56). Die Aufgaben, die diese Komponenten in der natürlichen extrazellulären Matrix übernehmen, müssen von der künstlich hergestellten Matrix ebenfalls erfüllt werden. Eine synthetische Trägerstruktur hat drei Hauptaufgaben zu übernehmen. Sie enthält die Zellen und ermöglicht die Migration der Zellen im Körper des Patienten. Des Weiteren stellt sie einen dreidimensionalen Raum für die Gewebebildung bereit und lenkt die Entwicklung des Gewebes (56).

Für die Herstellung der Matrizes werden verschiedenste Ansätze und Verfahren verfolgt. So kommen für das Tissue Engineering von weichen Geweben hauptsächlich Scaffolds aus Kollagen, Fibrin oder Seide zur Anwendung. Da diese Materialien humanen bzw. tierischen Ursprungs sind, sind diese nicht in großem Maße verfügbar und können auch von Batch zu Batch variieren (57, 58). Daher greift man auf synthetisch hergestellte Substanzen zurück. Die am häufigsten zum Einsatz kommenden Materialien sind Polyglykolsäure (PGA), Poly-L-Milchsäure (PLLA), sowie Co-Polymere von Polylactid-co-Glycolid (PLGA) (56). Der Abbau dieser Polymere erfolgt über Hydrolyse, somit entsorgt der Körper die Abbauprodukte über seine Atmungswege. Wegen ihrer thermoplastischen Eigenschaft werden aus diesen Polymeren mittels Extrusion oder Gießverfahren Trägerstrukturen hergestellt (58). Eine andere Möglichkeit um Ausgangsstoffe für die Matrizes zu erzeugen ist die Synthese durch Bakterien (59). Auf diese Weise können Kollagen-, Seiden- und Elastin-ähnliche Proteine gewonnen werden (56). Häufig kommen auch Alginate aus Seetang zum Einsatz (60). Alle diese Proteine und Polymere können sowohl als Gele oder als durch Elektrospinning erzeugte Nanofaserkonstrukte eingesetzt werden. Das Elektrospinning ermöglicht es, sowohl Scaffolds mit ungerichteten als auch mit parallelen Fasern herzustellen, je nach Gewebe, welches gezüchtet werden soll. Parallel ausgerichtete Fasern sind zum Beispiel für Muskelgewebe vorteilhaft, da die Zellen Muskelfasern bilden, die in dieser Art angeordnet sind (61).

Für das Tissue Engineering von härteren Geweben wie zum Beispiel Knochen, können Gele und elektrogesponnene Matrizes nur bedingt eingesetzt werden. In diesem Bereich, gerade wenn es um Knochendefekte von kritischer Größe geht, greift man beim Tissue Engineering von Knochen auf Granulate oder Zylinder aus Hydroxyapatit (62) und Trikalziumphosphat (63) zurück. Diese Materialien kommen der Festigkeit des Knochens am nächsten. In Fall von Kalziumhydroxyapatit kommt das

Material auch im nativen Knochen vor. Bei kleinen Knochendefekten kommen jedoch auch Hydrogele (64) und elektrogespinnene Matrizes zum Beispiel aus Polycaprolacton (PCL) (65) zum Einsatz.

1.4 Technische Komponenten für das Tissue Engineering

Damit Tissue Engineering durchgeführt werden kann, werden neben den Zellen und den Matrizes auch noch einige technischen Komponenten für die Herstellung der Matrizes sowie für die Kultivierung der Gewebe benötigt.

1.4.1 Elektrospinning-Anlage

Das Elektrospinnen ist eine Technik, mit der mittels elektrostatischer Wechselwirkungen Polymerfasern im Nanometerbereich hergestellt werden können. Als Ausgangsstoff können Schmelzen oder Lösungen aus Polymeren verwendet werden. 1934 meldete Anton Formhals die ursprüngliche Technik des Elektrospinnens zum Patent an (66). Bis zu den frühen neunziger Jahren erhielt diese Technik nur wenig Beachtung. Mit dem steigenden Interesse an der Mikro- und Nanotechnologie erfährt das Elektrospinnen derzeit ein Comeback (67). Für das Tissue Engineering sollen die Filamente der extrazellulären Matrix nachgebildet werden. Diese Fasern liegen in einem Größenbereich von 100-500 nm. Daher wird in der medizinischen Forschung am häufigsten das Elektrospinnen aus Lösungen für die Herstellung solcher Fasern angewandt. Mit dieser Methode können Fasern in einem Größenbereich von >10 nm hergestellt werden. Aus Schmelzen hingegen ist es lediglich möglich Fasern >500 nm herzustellen (67).

Für den Aufbau einer Elektrospinning-Anlage sind folgende Hauptkomponenten nötig (66):

- ein Reservoir für die Polymerlösung mit einer Spindüse (meist eine stumpfe Kanüle aus Metall)
- eine geerdete Kollektorplatte
- eine Hochspannungsquelle

Das Reservoir wird mit der Polymerlösung befüllt und an der Pumpe installiert. Die stumpfe Nadel, welche mit dem Reservoir verbundene ist, dient als Düse für die Polymerlösung. Zum Auffangen der erzeugten Fasern kommt eine Kollektorplatte zum Einsatz, welche aus einem leitenden Material besteht. Diese ist genauso wie die Nadel mit der Hochspannungsquelle verbunden, wobei die Nadel an den Pol und die Kollektorplatte an die Erdung der Hochspannungsquelle angeschlossen wird (Abbildung 4).

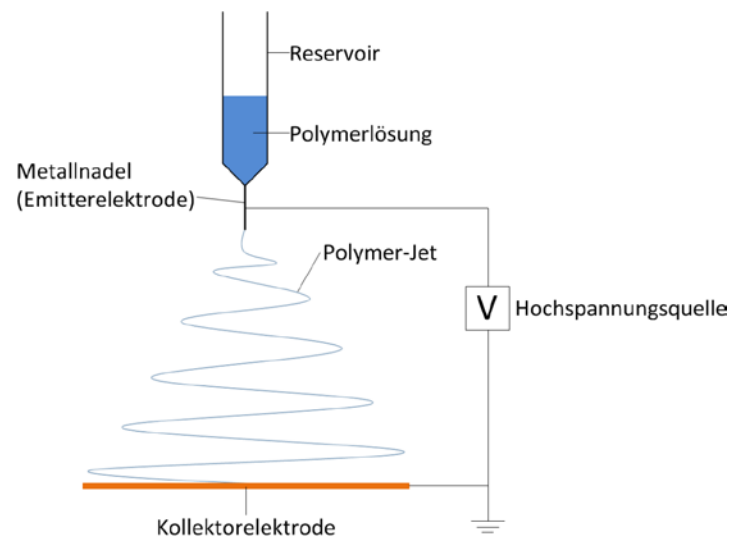


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Elektrospinning-Anlage

Eine Elektrospinning-Anlage besteht aus einem Reservoir für die Polymerlösungen, an dem eine Emitterelektrode, meist eine Metallnadel, angebracht ist. In einem definierten Abstand zum Reservoir mit der Emitterelektrode ist eine Kollektorelektrode installiert. Die beiden Elektroden sind an eine Hochspannungsquelle angeschlossen, wobei an der Emitterelektrode eine Spannung angelegt wird und die Kollektorelektrode geerdet wird. Durch die Spannung an der Emitterelektrode bildet sich an dieser ein Jet der Polymerlösung aus. Auf dem Weg von der Emitterelektrode zur Kollektorelektrode verdampft das Lösungsmittel der Polymerlösung und es bilden sich Polymerfäden, die sich auf der Kollektorelektrode ablagern.

Für die Herstellung von Nanofasern mit einer Elektrospinning-Anlage, muss die Nadel unter Spannung gesetzt werden (67). Mittels der Pumpe wird die Polymerlösung aus dem Reservoir in die Nadel gepumpt. Erreicht die Lösung die Nadelspitze, formt sie einen Tropfen. Durch die angelegte Spannung an der Nadel erfolgen eine Ladungstrennung in der Polymerlösung sowie eine Summierung der Ladung im Tropfen an der Nadelspitze. Dieser Tropfen verformt sich wiederum aufgrund der aufsummierten Ladung in einen Kegel, den sogenannten Taylor-Kegel (68). Da die Kollektorplatte geerdet ist, bildet sich zwischen ihr und der Nadel ein elektrostatischer Feldgradient aus. Überwindet die Ladung durch das Ansteigen der Spannung die kohäsiven Kräfte des Kegels, so emittiert an der Spitze des Kegels ein sehr dünner Faden, der sogenannte Jet (69). Dieser Faden fliegt durch den elektrostatischen Feldgradienten in Richtung der Kollektorplatte und lagert sich auf ihr ab (67). Am Anfang beschreibt der Jet eine lineare Flugbahn, welche allmählich in eine spiralförmige Flugbahn übergeht. In dem Zeitraum, den der Faden benötigt um bis zur Kollektorplatte zu gelangen, verdampft das Lösungsmittel der Polymerlösung. Dies führt dazu, dass sich im Idealfall eine trockene Nanofaser auf der Kollektorplatte ablagert (68).

Je nach Art des Aufbaus der Elektrospinning-Anlage können Matrices mit chaotisch angeordneten Fasern oder mit Fasern in einer definierten Orientierung hergestellt werden. Benutzt man einen Aufbau mit fest angebrachter Düse und Kollektorplatte so entsteht ein Scaffold mit chaotisch angeordneten Fasern. Ist jedoch die Nadel beziehungsweise die Kollektorplatte oder beide beweglich angebracht, so können Trägerstrukturen mit orientierten Fasern hergestellt werden. Zur Erzeugung von Fasern höchster paralleler Anordnung wird eine sich drehende Walze als Kollektor eingesetzt (67). Eine weitere Möglichkeit, eine spezielle Anordnung der Fasern herbeizuführen, ist die Modifikation des elektrostatischen Feldes. Dies kann mit parallel angeordneten Kollektoren oder durch das sogenannte „gap spinning“ umgesetzt werden. Hierbei werden die Kollektoren, getrennt durch ein nichtleitendes Material, in einem definierten Abstand angebracht. Durch eine sequenziell geschaltetes Erden der Kollektoren wird das Ablagern der Fasern beeinflusst (67).

Damit eine geeignete Matrix für das Tissue Engineering produziert werden kann, ist nicht nur die Orientierung der Fasern wichtig, sondern auch deren Dicke und Morphologie. Beides kann mittels der angelegten Spannung und der Viskosität der Polymerlösung beeinflusst werden (70). Jedoch gibt es für die Polymerlösungen Mindest- sowie Höchstkonzentrationen. Je niedriger konzentriert die Polymerlösung ist, desto höher ist die Gefahr, dass sich eine perlenschnurartige Faser ausbildet. Ist die Polymerlösung zu hoch konzentriert, kann es sein, dass der Tropfen an der Spitze der Nadel austrocknet und somit kein Jet zustande kommt. In Bezug auf die Faserdicke wird diese mit zunehmender Viskosität größer (29). Ebenso werden die Fasern von der angelegten Spannung beeinflusst. Bei einer zu niedrigen Spannung ist die Abfuhr der Polymerlösung durch den Jet zu niedrig und der Tropfen an der Düse wird immer größer, was zur Folge haben kann, dass Tropfen auf die Matrix gelangen und diese zerstören. Wird eine zu hohe Spannung angelegt, führt dies dazu, dass der Taylor-Kegel immer kleiner wird, was wiederum die Bildung einer perlenkettenartigen Faser zu Folge hat (71). Des Weiteren haben auch die Umgebungsbedingungen einen Einfluss auf den Spinningprozess. Diese beeinflussen die Trocknung der Fasern auf dem Weg von der Emitter- zur Kollektorelektrode, sowie deren morphologische Beschaffenheit (67).

Damit der Prozess des Elektrospinnens dauerhaft ohne Qualitätseinbrüche verlaufen kann, dürfen die Umgebungseigenschaften somit nicht außer Acht gelassen werden. Folgende Parameter müssen kontrolliert und geregelt werden, damit einheitliche Fasern entstehen (67):

- Luftfeuchtigkeit
- Temperatur
- absoluter Druck

- Anteil des gasförmigen Lösungsmittels

Das Trocknungsverhalten der Fasern kann durch jeden dieser vier aufgeführten Punkte beeinflusst werden. Des Weiteren kann die Luftfeuchte einen Effekt auf die Dissipation der Ladung in den Fasern haben. Die Temperatur hat neben dem Trocknungsverhalten der Fasern auch einen Einfluss auf die Fasern und kann eine Änderung des Durchmessers bewirken (67).

1.4.2 Inkubatoren

Die wichtigste technische Anlage im Tissue Engineering und der Zellkultur sind Inkubatoren. Diese sind dafür verantwortlich, dass für die Zellkultur wichtige Parameter, wie Temperatur und CO₂-Gehalt konstant auf einem idealen Niveau zur Verfügung gestellt und gehalten werden. Ein Großteil der Inkubatoren sind Brutschränke mit den Abmaßen von 920 mm Breite, 855 mm Höhe und 775 mm Tiefe. Aus den Maßen ist ersichtlich, dass diese Art von Inkubatoren einen großen Teil des Labors durch ihre Größe einnimmt. Für die Kultur von Zellen in Zellkulturflaschen ist solch ein Brutschrank perfekt ausgelegt, da mehrere Zwischenböden in ihn eingehängt werden können und somit bei einem Innenraumvolumen von 220 l sehr viel Fläche zur Verfügung steht. Derartige Inkubatoren sind für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings limitiert, da in vielen Anwendungen des Tissue Engineerings Gewebeäquivalente in einem Bioreaktor aufgebaut werden. Der Bioreaktor bildet dabei eine Kammer, in der die zellbesiedelte Matrix mit Nährmedium versorgt wird und zu einem Gewebe heranreift. Damit das Konstrukt in Bioreaktor mit Medium versorgt werden kann, sind für solch ein Kultursystem neben dem Bioreaktor noch ein Mediumreservoir und Schlauchverbindungen erforderlich. Da die Kultursysteme in den meisten Fällen nur ein abgeschlossenes Fluidsystem darstellen, wird eine Einheit benötigt, die die notwendigen Umgebungsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Atmosphäre bereitstellt. Dafür werden die Standardzellkulturinkubatoren eingesetzt. Jedoch werden die Kulturen der Gewebe häufig unter dynamischen Bedingungen durchgeführt. Dies macht eine Pumpe für die Förderung des Kulturmediums notwendig, die in Standardinkubatoren für Zellkulturanwendungen nicht integriert sind. Es ist möglich, eine Pumpe in den Innenraum des Inkubators zu stellen, was mit hohen Einbußen an Stellfläche verbunden ist. Somit ist es häufig nur möglich ein bis zwei derartige Kulturen in einem Inkubator zu betreiben. Des Weiteren wird durch die benötigten Elemente des Kultursystems der Aufbau auf solch engem Raum unübersichtlich und unzugänglich für mögliche Probenentnahmen. Eine weitere Möglichkeit solch ein Kultursystem in einem Standardinkubator zu betreiben ist, die Pumpe außerhalb des Brutschrankes zu platzieren und das Schlauchsystem durch eine Öffnung an der Rückseite des Inkubators zur Pumpe zu führen. Dadurch ist es möglich mehrere Kulturen gleichzeitig zu betreiben.

Der Nachteil ist jedoch, dass ein Teil des Schlauchsystems der Raumtemperatur ausgesetzt ist und sich das Medium dadurch um 2 bis 3 °C unter die nötigen 37 °C abkühlen kann, was beim Menschen einer leichten Unterkühlung entspricht. Alle diese Punkte zeigen, dass ein Standardinkubator für Anwendungen in Tissue Engineering eingesetzt werden kann, man jedoch Kompromisse hinsichtlich Platz, Temperatur und Kulturbedingungen eingehen muss.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Herzmuskelpatch zu entwickeln, welche dem nativen Herzmuskelgewebe möglichst nahekommt. Damit dieses Ziel erreicht werden kann sollen in dieser Arbeit ebenfalls die technischen und mechanischen Apparaturen für die Generierung und Kultur eines solchen kardialen Gewebes entwickelt werden. Somit kann die Arbeit in drei Themenblöcke eingeteilt werden. Der erste Themenblock beschäftigt sich mit der Entwicklung der Gerätschaften, die für die Kultur der Konstrukte und die Herstellung verschiedener Matrizes als Grundlage der Gewebe benötigt werden. Dabei handelt es sich um ein Inkubatorsystem beziehungsweise eine Reaktorplattform, eine druckgesteuerte Pumpenwand für die Dezellularisierung von Geweben und eine Elektrospinninganlage. Im nächsten Themenblock werden mögliche Matrizes für das kardiale Tissue Engineering generiert und hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die Entwicklung eines Herzmuskelpatches betrachtet. Das Augenmerk liegt hierbei auf der dezellularisierten small intestinal submucosa (SIS) (72), dem dezellularisierten porzinem Herz und auf verschiedenen elektrogesponnenen Matrizes. Der letzte Themenblock beinhaltet die Auswahl der geeigneten Zellquellen und deren Kombination miteinander für die Heranzüchtung eines Herzmuskelpatches.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In dem folgenden Abschnitt werden alle in der Arbeit zur Anwendung gekommenen Materialien aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung aller eingesetzten Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Becherglas	Schott AG, Mainz, Deutschland
Blutbeutel	Maco Pharma International GmbH, Langen, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Druckdom	HJK Sensoren + Systeme GmbH & Co. KG, Merching, Deutschland
Eibettkassetten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	nerb plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Kryoröhrchen	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Luer-Lock-Konnektoren	MEDNET GmbH, Münster, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger aus Glas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
O-Ringe (27x2,5; 37x3)	Dichtelemente arcus GmbH, Seevetal, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen \varnothing 10 cm, beschichtet mit Poly-D-Lysin	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Petrischalen (\varnothing 10 cm, \varnothing 15 cm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Petrischalen mit Glasboden	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Pinzetten	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	nerb plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Pumpschlauch	Ismatec/Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Silikonschläuche	Saint-Gobain, Aachen, Deutschland
Skalpellhalter	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellklingen	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenfilter Minisart (hydrophob)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilfilter	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Well-Platte	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75, T150)	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Zellsieb	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.2 Geräte

Alle aufgelisteten Geräte kamen in den verschiedenen Prozessen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Tabelle 2: Auflistung der eingesetzten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Abzug	Prutscher Laboratory Systems GmbH, Neudörfel, Österreich
Autoklav	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Blockstation	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Sensor (CO ₂ Engine-BLG™)	CO2Meter.com; Ormond Beach, USA
Dampfgarer	Braun/De'Longhi Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Drucksensor (SP 884)	HJK Sensoren + Systeme GmbH & Co. KG, Merching, Deutschland
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Einfrierbehälter	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Feinwaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Konfokales Mikroskop	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetischer Heizrührer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührstäbchen	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Peristaltische Pumpe	MCP-Standard; IDEX Health & Science GmbH; Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Power Supply	Gamma High Voltage, Ormond Beach, USA
Rasterelektronenmikroskop DSM940	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Rotationsmischer	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK

Bezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific
Spritzenpumpe	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Deutschland
Steuerung (ET200S)	Siemens AG, München, Deutschland
Temperatursensor	TC Mess- und Regeltechnik GmbH, Mönchengladbach, Deutschland
Trokenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Vortex	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wärmeschrank	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad für Paraffinschnitte	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

2.3 Chemikalien

Folgende Aufstellung von Chemikalien gibt alle eingesetzten Chemikalien in den Versuchen der Arbeit wieder

Tabelle 3: Auflistung der Chemikalien der verschiedenen Versuche

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	33539-2.5-GL-R-D
Akkutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	A6964

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor® 488 AcLDL	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	L-23380
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Satori GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland	AL 120R500
Ascorbinsäure	Laborbedarf Schneller M. GmbH & Co. KG, Estenfeld, Deutschland	A36040250
B27® Supplement (50x)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	17504-044
bFGF	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland	100-18B
CellTracker™ Deep Red Dye	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	C34565
CellTracker™ Green CMFDA Dye	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	C7025
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	62248
Dispase	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	17105-041
DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	10938-025
DMEM/Ham's F12	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	31331-028
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	8418-100ml
EGF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	E4127
Entellan®	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	1.079.610.500
Eosin	MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	10177.01000

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K928.4
FCS (LOT: BS210601.5)	Bio & SELL GmbH, Feucht, Deutschland	FCS.ADD.0500
Fibronectin	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	33016015
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	22151
Hämatoxylin	MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	10231.01000
Hoechst	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA	R37605
IMDM	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	31980-022
Kardiotrophin1	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland	300-32
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	10103578001
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	7513-100ml
MSCGM-CDr	Lonza Group AG, Köln, Deutschland	190632
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	D6750
Paraformaldehyd-Lösung 4 % (w/v) (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	P087.3
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	D8537
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	P433-100ml
Polycaprolacton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	440744
RPMI 1640	life technologies GmbH, Darmstadt,	61870-044

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
	Deutschland	
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	D6750-500g
Thrombin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	T4393
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	T8154
Trypsin-EDTA (10x)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	15400-054
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	P1379
VascuLife®	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, Deutschland	LL-0005
Versen	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	15040066
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9713.1
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	M7522

2.4 Antikörper

Die aufgelisteten Antikörper wurden für die Charakterisierung der verschiedenen Gewebe, welche in dieser Arbeit behandelt werden eingesetzt.

Tabelle 4: Auflistung aller eingesetzten Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
CD31	antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland	ABIN 726140
alpha Actinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	HPA006035
alpha smooth muscle actin	Abcam plc, Cambridge, UK	ab7817
cardiac Troponin C	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-48347
cardiac Troponin T	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	HPA0015774
Alexa Flour 647 donky anti mouse	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	A-31571
Alexa Flour 647 donky anti rabbit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	A-31573
Alexa Flour 555 donky anti mouse	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	A-31570
Alexa Flour 555 donky anti rabbit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	A-31572

2.5 Lösungen

Im folgenden Abschnitt sind alle Lösungen, die für die verschiedenen Arbeitsschritte benötigt wurden in ihrer Zusammensetzung aufgeführt.

2.5.1 Dezellularisieren

Dezellularisierungslösung für Small intestinal submucosa mit Serosa

34 g Natrium deoxycholate gelöst in 1 l Reinstwasser

Dezellularisierungslösung für porcines Herzgewebe

50 g Natrium deoxycholate gelöst in 1 l Reinstwasser

2.5.2 Zellkultur

Dispase für iPSC-Zellkultur

2 mg Dispase gelöst in 1 ml DMEM/F12

2.5.3 Histologische Lösungen

Alcianblau-Lösung

Alcianblaupulver	1 g
konzentrierte Essigsäure	1 ml
VE-Wasser	99 ml

Alkalischer Alkohol

Ammoniumhydroxid	10 ml
Ethanol 96 %	90 ml

Blockierlösung

Antikörperverdünnungslösung	nach Bedarf
Serum der Spezies des Sekundärantikörpers	5 %

Brilliant Crocein-Säurefuchsin

Lösung A:

Brilliant Crocein R	0,1 g
konzentrierte Essigsäure	0,5 ml
VE-Wasser	99,5 ml

Lösung B:

Säurefuchsin	0,1 g
konzentrierte Essigsäure	0,5 ml
VE-Wasser	99,5 ml

Gebrauchslösung:

Lösung A	8 Teile
Lösung B	2 Teile

Eindecklösung

MOVIOL DABCO	nach Bedarf
DAPI	0,1 %

Eisenhämatoxilin-Lösung

Lösung A:

Hämatoxilin	1 g
Ethanol 96 %	100 ml

Lösung B

Eisen-III-Chlorid Hexahydrat	2,48 g
VE-Wasser	99 ml
konzentrierte HCl	1 ml

HCl-Alkohol

Ethanol 50 %	186,3 ml
HCl, 1 molar	13,7 ml

Saffron du Gatinais-Lösung

Saffron du Gatinaispulver	6 g
Ethanol 96 %	100 ml

Waschpuffer

PBS	1 l
Tween-20	0,5 %

2.6 Medien

Medium für Explantate

IMDM	500 ml
FCS	5 %
β -Mercaptoethanol	3,79 μ l

Medium für Kardiosphären

DMEM/Ham's F12	65 ml
IMDM	35 ml
FCS	3,5 ml
Glutamin	1 ml
B27	2 ml
β -Mercaptoethanol	0,69 μ l
EGF	25 ng/ml
Cardiotrophin1	4 ng/ml
bFGF	40 ng/ml
Thrombin	1 U/ml

Medium für iPS abgeleitet Kardiomyozyten

RPMI 1640
2 % B27 Supplement (50x)
1 % Penicillin/Streptomycin
0,4 % Ascorbinsäure (25 mg/ml)
0,2 % β -Mercaptoethanol (50 mM)

2.7 Methoden

Da der Bereich des Tissue Engineerings eine interdisziplinäre Fachrichtung ist, kommen Methoden aus verschiedensten Bereichen, wie der Zellkultur, der Histologie und der Ingenieurwissenschaft zum Einsatz. Das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Bereiche schafft eine Plattform mit optimalen Bedingungen und Grundlagen für das Aufbauen verschiedenster Gewebearten.

2.7.1 Dezellularisierung von Geweben

Jedes Gewebe im menschlichen Körper besteht zum Großteil aus der extrazellulären Matrix (ECM) in die die Zellen eingebettet sind. In der extrazellulären Matrix erfahren die Zellen durch verschiedenste Signalstoffe Reize, die ihnen ihre Aufgabe mitteilen, beziehungsweise deren Verhalten beeinflussen. Für den Aufbau eines Gewebes ist es von Vorteil, den Zellen, die das Gewebe bilden sollen, eine möglichst native Umgebung, welche die Signalstoffe beinhaltet, zu bieten. Aus diesem Grund werden häufig die entsprechenden tierischen Gewebe dezellularisiert und deren Matrix als Trägerstruktur genutzt. Zum Herauslösen der Zellen aus den verschiedenen Geweben sind Protokolle für die Dezellularisierung der entsprechenden Gewebe nötig. Bei der Erstellung der Protokolle sollte vorrangig die Dicke sowie die Festigkeit des Gewebes berücksichtigt werden. Anschließend erfolgt die Auswahl geeigneter Chemikalien für die Dezellularisierung sowie für die Optimierung der Zeitintervalle der verschiedenen Dezellularisierungsschritte. Die Auswahl der Chemikalien hängt neben ihrer Effektivität auch von ihrer Eigenschaft ab, wichtige Matrixbestandteile wie zum Beispiel elastische Fasern oder Proteine nicht aus der Matrix herauszulösen. Ebenso besteht ein Unterschied, ob das Gewebe aktiv mit der Dezellularisierungslösung durchspült oder ob es darin eingelegt wird.

Alle für die Dezellularisierung vorgesehenen Gewebe wurden gemäß den Regularien des Deutschen Tierschutzgesetzes (§4 Abs. 3) entnommen.

2.7.1.1 Small intestinal submucosa mit Serosa

Eine gleichbleibende Qualität der Small intestinal submucosa mit Serosa (SISser) ist für Forschungszwecke sehr wichtig, um diese gewährleisten zu können, erfolgte die Dezellularisierung gemäß der am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (LTERM) etablierten Standardarbeitsanweisung (SOP) (siehe Anhang, ab Seite 123). Zu Beginn der Dezellularisierung der SISser wurde der Gefäßbaum des Darmes vollständig entfernt und das entnommene Darmstück in ca. 50 cm lange Stücke geschnitten. Anschließend erfolgte eine gründliche Spülung der Darmsegmente unter fließendem Leitungswasser um alle Speisereste sowie Bakterien zu entfernen und eine erneute Zerteilung des Darmgewebes in ca. 10 cm lange Stücke. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Peyerschen Plaques in den zugeschnittenen Stücken liegen. Als nächstes folgte das Abschaben der Mucosa, wofür die Darmstücke mit der Mucosaseite nach außen über ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gezogen und mit dem Griffende einer Pinzette die Mucosa abgeschabt wurde. Beim Entfernen der Mucosa dürfen keine Löcher in der Matrix entstehen. Zum Abschluss der ersten Arbeitsschritte wurden die Darmstücke über Nacht in PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) auf einem Wippschüttler

bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Darmstücke an einem Ende mit einer Klemme abgedichtet, das Innere des Schlauches mit Dezellularisierungslösung aufgefüllt und das zweite Ende ebenfalls fest mit einer weiteren Klemme verschlossen. Die befüllten Matrixstücke inkubierten anschließend für weitere 1,5 Stunden in einem mit Dezellularisierungslösung gefüllten Becher auf dem Wippschüttler bei 4 °C. Im Anschluss an diese Inkubation erfolgte die Entleerung und Ausstreichung der Darmstücke, um ausgelöste Zellen zu entfernen, gefolgt von einer weiteren Befüllung der Gewebestücke mit PBS mit anschließender einstündiger Inkubation bei 4 °C auf dem Wippschüttler. Nach dieser Stunde wurden die Enden der Matrixröhre, an denen sich die Klammern befanden, abgeschnitten und der SIS-Schlauch 5-mal mit frischem PBS mit 1 % Pen/Strep für jeweils eine Stunde gewaschen. Der letzte Schritt der Dezellularisierung war das Umsetzen der Matrixstücke in frisches PBS ohne Antibiotika, in welchem der Versand der SISser zur Sterilisation mittels Gammastrahlung erfolgte. Anschließend lagerten die Darmstücke bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung.

2.7.1.2 Porzines Herz

Die Durchführung der Dezellularisierung des kompletten Schweineherzens erfolgte wie bei Weymann et al. (73) per retrograder Perfusion. Dazu wurde eine Kanüle in die Aorta eingenäht und die Aorta mit einer Klemme über der Kanüle dicht verschlossen. Damit die Perfusionslösung wieder aus dem Herz ausströmen konnte, mussten die Herzohren geöffnet werden. Für die Dezellularisierung war es notwendig, das Herz freischwebend in ein 2000 ml Becherglas zu hängen und mit einem Pumpkreislauf zu verbinden. Der Pumpkreislauf bestand aus einer Flasche, die als Sedimentationsflasche für Matrixstücke diente, einem Pumpschlauch, einem Drucksensor und einem Reservoir. Als Reservoir fungierte das Becherglas, in welches das Herz eingehängt war. Durch einen Silikonschlauch wurde die Perfusionslösung über die Pumpe in die Sedimentationsflasche gepumpt. Von dort aus erfolgte der Zufluss der Lösung über den Drucksensor ins Herz (Abbildung 5). Alle Spül- sowie Dezellularisierungsschritte des Schweineherzens fanden unter einem konstanten Druck von 100 mmHg statt. Mit zunehmendem Grad der Dezellularisierung des Herzens erhöhte sich der Volumenstrom bei gleichbleibenden Druckbedingungen aufgrund der zunehmenden Durchlässigkeit der Matrix. Über den gesamten Prozess hinweg bewegte sich der Volumenstrom in einem Intervall von 36 ml/min bis 820 ml/min.

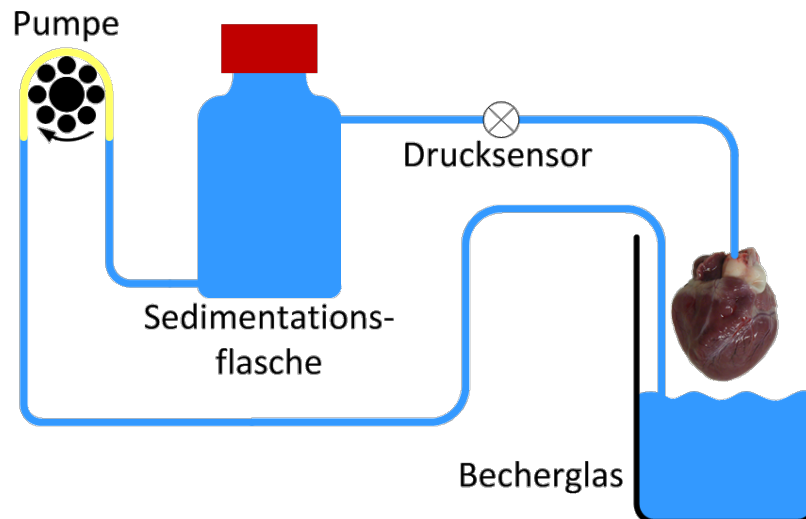


Abbildung 5: Schema Dezellularisierung Schweineherz

Die verschiedenen Lösungen werden aus dem Becherglas, welches als Reservoir dient, mittels einer Peristaltikpumpe in eine Sedimentationsflasche gepumpt. In dieser Flasche setzen sich Schwebeteilchen, welche das feine Gefäßsystem der Koronargefäße verstopfen könnten, ab. Über die Sedimentationsflasche gelangen die Lösungen in das Gefäßsystem des Herzens. Der Drucksensor erfasst den Ist-Druck des Systems. Durch den eingestellten Soll-Druck wird die Drehzahl der Pumpe geregelt.

Zu Beginn des Dezellularisierungsprozesses wurde das Herz 24 Stunden bei Raumtemperatur mit auf 37 °C erwärmten PBS gespült um alle Blutreste aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 24 stündige Perfusion mit konstant auf 37 °C erwärmter Dezellularisierungslösung, gefolgt von einem Waschschrift mit wiederum auf 37 °C erwärmtem PBS für 24 Stunden. Diese abwechselnde Perfusion mit PBS und Dezellularisierungslösung wurde in dieser Art und Weise zwei Wochen durchgeführt. Nach diesem Dezellularisierungsprozess wurde die Matrix gekühlt zur Sterilisation mit Gammastrahlung geschickt und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.7.2 Programmierung

Die Programmierung der Steuerung der Dezellularisierungswand, des Inkubators sowie der Bioreaktorplattform wurde mit dem TIA Portal V13 vorgenommen. Dieses Programm ist speziell für die Programmierung von SPS-Steuerungen der Firma Siemens entwickelt worden. Bei allen Systemen kommt die Steuerung ET200S von Siemens zum Einsatz.

2.7.3 Elektrospinning

Elektrospinning bietet die Möglichkeit, definierte Scaffolds für den Aufbau von Geweben zu generieren. Mit dieser Methode können aus Polymeren Nonofasermatten erzeugt werden. Das Spinnen der Matten aus Polycaprolacton (PCL) erfolgte aus Lösungen mit den Lösungsmitteln Hexafluorisopropanol (HFP) beziehungsweise Chloroform. Es wurden Scaffolds aus einer 10 %igen, einer 15 %igen und einer 20 %igen PCL-Lösung, ebenso wie aus einem Gemisch bestehend aus einer 15 %igen PCL-Lösung welche 0,8 % pulverisierte porzine Herzmatrix enthielt, sowie einer 12 %ige Lösung, welche sich aus drei Teile PCL und einem Teil Gelatine zusammensetzt, gesponnen. Als Lösungsreservoirs dienten Glasspritzen, die mit Hilfe von Spritzenpumpen mit einer Pumprate von 0,4 ml/h ausgedrückt wurden. Zum Verspinnen der Lösungen fanden Kanülen mit einem Außendurchmesser von 18 G (Gauge) Verwendung. Die Lösung, bestehend aus einer 15 %igen PCL-Lösung mit 0,8 % pulverisierter porziner Herzmatrix, wurde mit einer 17 G Kanüle versponnen. Das Verspinnen der Lösungen erfolgte unter der am besten geeigneten Spannung. Welche Spannung genutzt wurde, orientierte sich an folgenden Punkten: (I) Form und Stabilität des Taylor Cone sowie (II) Ausbildung eines stabilen Jets. Alle eingesetzten Spannungen lagen in einem Bereich zwischen 5 kV und 10 kV.

2.7.4 Zellkultur

Damit komplexe Gewebe aufgebaut werden können, sind eine Vielzahl an Zellarten nötig, die auf verschiedene Arten isoliert werden und in den meisten Fällen unterschiedliche Nährmedien und Wachstumsoberflächen benötigen. Die Isolation der Zellen erfolgte nach der Einverständniserklärung des Spenders gemäß des Votums 182/10 des Ethikrates des Universitätsklinikums Würzburg.

2.7.4.1 Kardiosphären abgeleitete Zellen

Die Kardiosphären abgeleiteten Zellen (CDC) können aus Biopsien des humanen Herzhohls generiert werden. Dazu wurde, falls Fettgewebe am Gewebestück vorhanden war, dieses mit dem Skalpell entfernt und die Biopsie in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 2 mm geschnitten. Anschließend sind die Stücke in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit einer Verdauungslösung bestehend aus 2 ml Trypsin und 400 µl Kollagenase A für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und währenddessen alle 5 Minuten geschüttelt worden. Auf das Abstoppen des Verdauens nach dieser Inkubationszeit durch Zugabe von 1 ml FCS folgte eine Zentrifugation der Gewebestücke mit einer Drehzahl von 300 xg für 5 Minuten. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt, die Stücke in 5 ml frischem Medium für Explantate resuspendiert und auf mit 1 %iger Gelatinelösung beschichteten Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung

der Gewebestücke erfolgte mit insgesamt 5 ml des Mediums für Explantate je Schale sowie bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach vier bis fünf Tagen begannen Zellen aus den Gewebstücken auszuwachsen und das Medium konnte zum ersten Mal gewechselt werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Medienwechsel dreimal wöchentlich durchgeführt. Sobald die Petrischale zu 80 % mit Zellen bewachsen war, konnten diese mit Trypsin von der Oberfläche der Schale abgelöst werden, ohne dass sich die Gewebestücke ablösten. Das Abstoppen des Trypsins erfolgte wiederum mit der Zugabe von je 1 ml FCS. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und die Gewebestücken mit frischem Medium überschichtet, da die Zellen noch über einen längeren Zeitraum aus den Gewebestücken auswachsen. Die Zellsuspension ist mit einer Drehzahl von 300 xg für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Medium für Kardiosphären resuspendiert worden. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zellzahl von maximal 2x10⁶ Zellen in eine Poly-D-Lysin beschichtete Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Nach ca. 3 Tagen konnten im Medium schwimmende Sphären beobachtet, mit dem Medium abgenommen und mit einer Drehzahl von 200 xg für 3 Minuten abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt und die Sphären mit Medium für Explantate resuspendiert und in einer mit Gelatine (1 %) beschichteten Schale in 5 ml Medium für Explantate ausgesät. Aus den angehafteten Sphären wuchsen nach einem Tag Zellen aus, die sogenannten CDCs. Die CDCs können mit Trypsin abgelöst und für Experimente eingesetzt werden. Das Verfahren zur Isolation der CDCs wurde in Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin etabliert und in Form einer SOP abgelegt.

2.7.4.2 Kardiale Differenzierung der CDC

Bevor die CDCs für Experimente eingesetzt werden konnten, wurde eine Differenzierung der Zellen in Kardiomyozyten induziert. Dazu ist dem Kulturmedium der Zellen 10 µM 5-Azacidin für 24 Stunden oder 10 nM Oxytocin für 72 Stunden zugesetzt worden. 5-Azacidin hemmt DNA-Methyltransferasen und verursacht somit eine Demethylierung, was laut Literatur zu einer kardialen Differenzierung führen kann. Zu Oxytocin wird in der Literatur geschrieben, dass es bei der kardialen Embryonalentwicklung beteiligt ist. Die Weiterführung der Kultur der Zellen nach der Behandlung erfolgte mit dem ursprünglichen Kulturmedium. Diese Zellen können für die Versuche eingesetzt werden.

2.7.4.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Die Kultur der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) erfolgte auf Matrigel®-beschichteten 6 Well-Platten. Für die Beschichtung der Well-Platten wurde in jedes Well zwei Milliliter einer Lösung bestehend aus 116,5 µl Matrigel® in 12 ml DMEM-F12 Medium ohne Glutamin gegeben und die Platte

mit geschlossenem Deckel bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit ist die Beschichtungslösung abgesaugt und die iPSCs in der gewünschten Aussaatdichte in die Wells gegeben worden. Die Kultur der Zellen erfolgte mit dem mTeSR™1 Medium (STEMCELL Technologies), wobei täglich jeweils zwei Milliliter des Kulturmediums in jedes einzelne Well gegeben wurden.

2.7.4.4 Passagieren von induzierten pluripotenten Stammzellen

Durchschnittlich wurden die in der 6 Well-Platte ausgesäten iPSCs alle drei Tage gemäß der entsprechenden SOP (siehe Anhang, ab Seite 135) passagiert. Anhaltspunkte, dass die Zellen gesplittet werden müssen, waren entweder, dass die Kolonien kurz davor waren, miteinander zusammenzuwachsen oder, dass die Zellen begannen in der Mitte der Kolonie übereinander zu wachsen. Tritt eine dieser morphologischen Veränderungen auf, so müssen die Zellen passagiert werden. Für die Erhaltungszucht der Zellen empfiehlt es sich die Zellen im Verhältnis 1:6 zu splitten, da es bei diesem Verhältnis ca. eine Woche dauert, bis die Zellen wieder eine Konfluenz erreicht haben, bei der sie wieder gesplittet werden müssen. Somit kann das Ansteigen der Passagen der Zellen verlangsamt werden. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturfläche wurde zuerst das Medium abgesaugt, durch 1 ml frisch angesetzte, sterile Dispase mit einer Konzentration von 2 mg/ml ersetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach fünf bis sechs Minuten begannen sich die Ränder der Kolonien zu lösen. Sobald dieser Zeitpunkt erreicht war, wurde die Dispase abgesaugt und die Zellen vorsichtig dreimal mit 1 ml DMEM-F12 gespült. Das endgültige Ablösen der iPSCs von der Kulturfläche erfolgte durch fünfmaliges Pipettieren von 1 ml DMEM-F12 über die Zellkolonien, so dass die Kolonien von der Oberfläche abschwammen. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 3 Minuten bei 200 xg abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in mTeSR™1-Medium resuspendiert und die Zellen in dem gewünschten Verdünnungsverhältnis auf Martigel beschichteten 6 Well-Platten ausgesät. Für die ersten 24 Stunden erfolgte die Kultur der iPS-Zellen in mTeSR™1-Medium mit 1 µl/ml 10 µM ROCK Inhibitor.

2.7.4.5 Differenzierung von iPSCs in Kardiomyozyten

Damit die iPS-Zellen für den Aufbau eines kardialen Patches verwendet werden können, wurden diese durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Edenhofer in Kardiomyozyten differenziert und für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Verfügung gestellt. Die Differenzierung erfolgte gemäß nachstehendem Protokoll, publiziert von Kadari et al. (36).

Den Ausgangspunkt für die kardiale Differenzierung bildeten iPS-Zellen, welche eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Der erste Schritt der Differenzierung erfolgte durch einen Medienwechsel zu dem

Medium RPMI 1640, welches 25 ng/ml BMP4, 5 μ M des Small Molecules CHIR99021, 2 % B27 Supplement (50x), 2 nM Glutamin und 50 μ g/ml L-Ascorbinsäure enthielt. Bei den folgenden Schritten diente das Medium RPMI 1640, versetzt mit Glutamin und L-Ascorbinsäure als Basalmedium. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgetauscht und durch das Basalmedium mit 5 μ M CHIR99021 ersetzt. Dieses Medium blieb für 18 bis 36 Stunden auf den Zellen, gefolgt von einer Kultur für 24 Stunden in Basalmedium mit 2 % B27 Supplement (50x) ohne Insulin. Als nächstes wurde für die folgenden 5 Tagen das Basalmedium mit dem WNT Inhibitor IWR1 für die Kultur benutzt. Im Anschluss erfolgte die Kultur der Zellen für 4 bis 5 Tage in dem Basalmedium, welches B27 Supplement (50x) mit Insulin beinhaltet, gefolgt von einer Kulturzeit von vier bis fünf Tagen in RPMI 1640 Medium ohne Glucose, versetzt mit 4 mM Natrium L-Lactat. Danach wurden die Zellen bis zu ihrer Verwendung für einen Versuch in dem Basalmedium kultiviert.

2.7.4.6 Mesenchymale Stammzellen

Die Isolation der mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus humaner Spongiosa des Hüftkopfs erfolgte gemäß der SOP (siehe Anhang, ab Seite 128) des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Dazu ist das Spongiosagewebe in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 20 ml vorgewärmten PBS aufgefüllt und kräftig geschüttelt worden, um die Zellen auszuwaschen. Sobald die Spongiosa nach dem Schütteln abgesunken war wurde der Überstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und das Auswaschen der Zellen so lange wiederholt, bis die Spongiosa eine weiße Farbe angenommen hatte. Durch eine Zentrifugation der gesammelten Zellsuspension über 5 Minuten mit 300 xg erfolgte die Abtrennung der Zellen vom Medium. Das Zellpellet wurde in 25 ml Medium resuspendiert und je nach Größe des Zellpellets in eine oder mehrere T150-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 3 Tagen konnte der Überstand aus der Flasche abgesaugt und die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen werden, um verbliebene Trümmer der Spongiosa und nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die Kultur der MSCs erfolgte mit 20 ml Kulturmedium bei zweimaligem Medienwechsel pro Woche.

2.7.4.7 Fibroblasten aus Hautbiopsie

Die Isolation von Fibroblasten aus Biopsien der adulten humanen Haut erfolgte gemäß der SOP (siehe Anhang, ab Seite 129) des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Zur Vorbereitung der Isolation musste das Biopsat dreimal mit PBS gewaschen, das Fett- und Bindegewebe sorgfältig entfernt und die Biopsie mit dem Skalpell in ca. 3 mm breite Streifen von ca. 3 mm Länge geschnitten werden. Diese Gewebestücke wurden in eine Petrischale überführt, vollständig mit Dispase-Lösung

überschichtet und über Nacht bei 4 °C für 16 bis 18 Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation ist die Dispase-Lösung abgesaugt und die Streifen in PBS überführt worden. Mit Hilfe von Pinzetten wurde die Epidermis von der Dermis abgezogen und beide Teile separat voneinander in Petrischalen mit PBS gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation der Dermisstreifen über 45 Minuten bei 37 °C in Kollagenase, wobei diese komplett mit der Lösung bedeckt waren, gefolgt von einer Zentrifugation der Gewebestücke von 5 Minuten mit 300 xg und des Verwerfen Überstandes. Als Letztes wurde das Pellet aus Gewebestücken und Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag mussten den Dermisstücken weitere 6 ml des Mediums zugegeben werden. Weitere 5 Tage später wurden die Dermisstücke, aus denen die Fibroblasten auswuchsen, aus der Flasche entfernt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte nach den Standards der Zellkulturtechnik.

2.7.4.8 mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Haut

Die Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen aus der humanen Haut erfolgte analog zur SOP (siehe Anhang, ab Seite 131) des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Der Anfang der Isolation der Endothelzellen entspricht dem zur Isolation der Fibroblasten. Jedoch wurde nach dem Trennen der Epidermis von der Dermis die Dermisstücke mit 10 ml Versen gespült und anschließend für 40 Minuten bei 37 °C mit Trypsin überschichtet. Durch die Zugabe von FCS konnte die Reaktion abgestoppt werden. Die Gewinnung der Endothelzellen erfolgte mittels ausstreichen der Endothelzellen aus den Dermisstücken. Dazu wurden die Dermisstücke in eine mit Vasculife® befüllte Petrischale überführt, mit der Rückenseite einer Skalpellklinge von jeder Seite achtmal unter leichtem Druck ausgestrichen und mit einer Aussaatdichte von $1,2 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 in eine Zellkulturflasche ausgesät.

2.7.4.9 Passagieren von adhärenenten Zellen

Alle adhärent wachsenden Zellen wurden in der gleichen Art und Weise gemäß der SOP (siehe Anhang, ab Seite 133) des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin von den Kulturflächen abgelöst, ausgenommen die iPS-Zellen und die iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. Sobald sich eine Konfluenz von 80 % eingestellt hatte, sind die Zellen passagiert worden. Zum Ablösen der adhärenenten musste zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 37 °C warmen PBS⁻ gespült werden. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37 °C mit einer 0,05 %igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, anschließend die Reaktion des Enzyms mit 10 % FCS abgestoppt, die Lösung mit einer Pipette dreimal über die gesamte Kulturfläche pipettiert, um Zellklumpen zu vereinzeln und verbliebene Zellen von der Kulturfläche zu lösen. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 300 xg und entfernen des

Überstandes, erfolgte das Lösen des Zellpellets im zellspezifischen Medium sowie die Bestimmung der Zellzahl. Je nach Zellart wurden die Zellen in geeigneter Dichte wieder ausgesät (Tabelle 5).

Tabelle 5: Aussaatdichten verschiedener adhärenter Zellen

Zellart	Medium	Ablösen	Aussaatdichte
Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS	Trypsin (3 Minuten)	$0,3 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$
MSCs	MSCGM-CD BulletKit (1 Supplementmix) + 2 % FCS (primär, bis 7d: + 1 % Antibiotikum)	Trypsin (3 Minuten)	$2,5 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$
Endothelzellen	Vasculife® + Supplemente, bis 7d: + 1 % Antibiotikum	Trypsin (3 Minuten)	$1,2 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$
CDCs	IMDM + 5 % FCS + 3,79 µl β-Mercaptoethanol	Trypsin (3 Minuten)	$0,3 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$
Zellen aus Herzohr	IMDM + 5 % FCS + 3,79 µl β-Mercaptoethanol	Trypsin (3 Minuten)	$0,3 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$
iPS-Zellen	mTeSR™1	Akkutase (5-10 Minuten)	1:6 splitten
iPS-abgeleitete Kardiomyozyten	RPMI + 2 % B27 + 0,4 % Ascorbinsäure (25 mg/ml) + 0,2 % β-Mercaptoethanol (50 mM)	Akkutase (5 Minuten)	werden nach Ablösen für Versuch verwendet

2.7.4.10 Besiedlung der SISser

Damit die SISser mit Zellen besiedelt werden konnte, wurde diese in sogenannte Zellkronen eingespannt (74). Die Zellkronen bestehen aus zwei Metallringen, welche bis zu einem bestimmten Punkt ineinandergeschoben werden können. Der äußere Ring steht auf vier Füßchen, damit Medium unter die eingespannte Matrix gelangen kann. Zur Besiedlung der eingespannten Matrix wurde die Zellkrone mit

eingespannter Matrix in eine 24-Well-Platte gestellt, die Zellen in 500 μ l Medium aufgenommen, die Zellsuspension in den inneren Ring der Zellkrone pipettiert und 30 Minuten lang inkubiert, damit die Zellen adhären konnten. Nach dieser Inkubationszeit ist das Well mit der Zellkrone mit weiteren 500 μ l Medium befüllt worden.

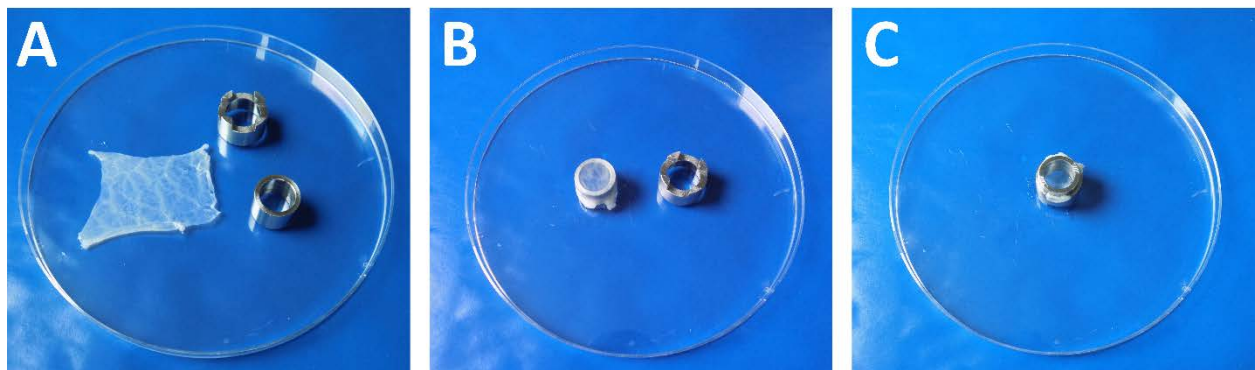


Abbildung 6: Einspannen der SISser in eine Zellkrone

Die SISser wird auf eine Größe von ca. 2 x 2 cm zugeschnitten (A) und über den inneren Ring (ohne Füßchen) der Zellkrone gestülpt (B). Danach wird der äußere Ring (mit Füßchen) über den inneren Ring mit der SISser geschoben, sodass die Matrix von den beiden Ringen fixiert ist (C). Stellt man die Zellkrone auf die Füßchen, so kann die SISser mit Zellen besiedelt werden, indem Zellsuspension in den inneren Ring pipettiert wird.

2.7.5 Histologie

Die Histologie ist eine wichtige Methode für die Charakterisierung von Geweben und Zellen. Innerhalb der Histologie gibt es verschiedene Färbungen zur Charakterisierung unterschiedlicher Gewebekomponenten. Zum Erhalt einer gleichbleibenden Qualität der Färbung der spezifischen Zielregionen wurden alle Techniken im Bereich der Histologie gemäß der am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerativen Medizin etablierten SOPs (siehe Anhang, ab Seite 137) durchgeführt.

2.7.5.1 Paraffineinbettung

Damit von Geweben Schnitte für histologische Färbungen gemacht werden können, werden diese häufig in Paraffin eingebettet.

Für die Paraffineinbettung mussten die Gewebe als erstes mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert werden. Die Dauer dieser Behandlung richtet sich nach Dicke und Beschaffenheit des Gewebes. Zur Orientierung wird im Laboralltag als Richtwert angenommen, dass das PFA in einer Stunde einen Millimeter in das Gewebe eindringt. Nach der Fixierung wurden die Gewebe in eine Einbettkassette gelegt und in einen

Einbettautomaten gegeben. Das Programm welches der Automat abarbeitete, enthielt folgende Schritte: 2 Stunden wässern in Leitungswasser, 1 Stunde in 50 %igem Ethanol, 1 Stunde in 70 %igem Ethanol, 1 Stunde in 90 %igem Ethanol, 1 Stunde in 96 %igem Ethanol, 1 Stunde in 2-Propanol, eine weitere Stunde in 2-Propanol, 1 Stunde in einem Gemisch aus einem Teil 2-Propanol und zwei Teilen Xylol, zweimal jeweils 1 Stunde in Xylol und jeweils 2 Stunden bei 60 °C in Paraffin. Unmittelbar im Anschluss an dieses Verfahren kann das Gewebe in Paraffin zu einem Block eingegossen werden.

2.7.5.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Eine Übersichtsfärbung zur Bewertung der Morphologie eines Gewebes ist die Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E). Bei dieser Färbung werden die Zellkerne sowie das Zytoplasma, also das Zellinnere, angefärbt. Durch die Färbung mit Hämatoxylin erscheinen die Zellkerne blauviolett, Eosin färbt das Zytoplasma rot.

Schnitte aus in Paraffin eingebetteten Geweben müssen vor der Färbung entparaffiniert werden. Dazu wurden die auf Objektträgern aufgezogenen Schnitte zuerst für 1 Stunde in einen 63 °C warmen Wärmeschrank gegeben, um das Paraffin anzuschmelzen. Direkt im Anschluss daran verweilten die Schnitte zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol, um den Rest des Paraffins zu entfernen. Als nächstes durchliefen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe, bestehend aus zweimal 96 %igem Ethanol, einmal 70 %igem Ethanol und einmal 50 %igem Ethanol. In den jeweiligen Alkoholen wurden die Schnitte jeweils dreimal auf- und abgetaucht. Nach der Alkoholreihe sind die Objektträger in VE-Wasser geschwenkt worden, um den restliche Alkohol zu entfernen. Das Anfärben der Kerne erfolgte durch eine Inkubation der Schnitte von 8 Minuten in Hämatoxylin mit anschließendem Auswaschen der überschüssigen Färbelösung mit VE-Wasser und abschließender Differenzierung des Hämatoxylins durch zweimaliges Eintauchen in HCl-Ethanol. Als nächstes wurden sie wieder mit VE-Wasser gespült und für 5 Minuten in Leitungswasser gegeben, damit der Farbstoff bläuen konnte. Unmittelbar nach diesem Schritt folgte eine Inkubation der Proben in Eosin für 1 Minute, welches das Zytoplasma und das Kollagen rot anfärbt. Danach wurden die Schnitte mit VE-Wasser gewaschen, um die überschüssige Farbe aus den Präparaten zu entfernen. Zum Schluss folgte eine aufsteigende Alkoholreihe beginnend mit zweimal Eintauchen in 70 %igem Ethanol gefolgt von 2 Minuten in 96 %igem Ethanol, dann jeweils zweimal für 5 Minuten in 2-Propanol und abschließend in Xylol. Als letztes sind die Schnitte mit Entellan® eingedeckt worden.

2.7.5.3 Feulgen-Färbung

Ein probates Mittel um den Dezellularisierungsgrad eines Gewebes feststellen zu können, ist eine Feulgen-Färbung. Mit Hilfe dieser Färbung kann die DNA rot-violett angefärbt werden. Somit kann überprüft werden, ob noch Zellen, Fragmente des Zellkerns, beziehungsweise DNA im dezellulierten Gewebe vorhanden sind. Die Abwesenheit der DNA, der sich ursprünglich auf der Matrix befindlichen Zellen ist erforderlich, damit keine Beeinflussung der Zellen, welche neu auf der Matrix ausgesät werden sollen, erfolgt.

Für eine Feulgen-Färbung mussten zuerst Paraffinschnitte der zu untersuchenden Probe angefertigt und anschließend entparaffiniert werden. Danach folgte eine Inkubation der Schnitte für 50 Minuten in HCl gefolgt von 2 jeweils zweiminütigen Waschschritten mit Wasser. Im Anschluss wurden die Schnitte 60 Minuten in Schiff's Reagenz gegeben, zweimal für jeweils 3 Minuten mit Natriumsulfit-Lösung gespült und anschließend zweimal mit Wasser für 2 Minuten gewaschen. Zum Schluss durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe bestehend aus 50 %igen Ethanol, 70 %igen Ethanol, 80 %igen Ethanol, 90 %igen Ethanol und Xylol. In jeder dieser Lösungen verweilen die Schnitte für 1 Minute. Nach diesen Entwässerungsschritten sind die Schnitte mit Entellan® eingedeckt worden.

2.7.5.4 Pentachrom-Färbung nach Movat

Eine Färbemethode zum Nachweis von Kollagenfasern und elastische Fasern in einem nativen oder dezellulierten Gewebe ist eine Pentachrom-Färbung nach Movat. Mit Hilfe dieser Färbung kann die Effektivität des Dezellularisierungsprotokolls hinsichtlich Verbleib und Unversehrtheit der Kollagenfaser sowie der elastischen Fasern überprüft werden. Bei dieser Färbemethode stellen sich die Kollagenfasern in einer gelben, die elastischen Fasern in einer schwarzen, Muskelgewebe in einer roten, Zellkerne ebenfalls in einer schwarzen und Fibrin in einer hellroten Färbung dar.

Zur Färbung von Paraffinschnitten der Proben mussten diese zuerst entparaffiniert, mit VE-Wasser gewaschen und für 10 Minuten in Alcianblau-Lösung gegeben werden. Danach folgte ein fünfminütiger Waschschriff mit VE-Wasser mit anschließender 60-minütiger Fixierung des Alcianblau mittels alkalischen Alkohols und eines weiteren fünfminütigen Waschschriffes mit VE-Wasser. Daraufhin sind die Kerne 10 Minuten mit Eisenhämatoxylin gefärbt und 1 Minute mit VE-Wasser gewaschen worden. Als nächstes wurden die Schnitte für 15 Minuten in Leitungswasser gewässert und danach für 30 Minuten in Brilliant Crocein Säurefuchsin gegeben, um die elastischen Fasern und das Zytoplasma anzufärben. Im Anschluss daran erfolgte eine Spülung der Schnitte mit 0,5 %iger Essigsäure sowie ein Differenzierungsschritt der Färbung über 15 Minuten in 5 %iger Phosphorwolframsäure. Anschließend

wurden die Proben wiederum für 5 Minuten mit 0,5 %iger Essigsäure und danach zweimal für jeweils 5 Minuten mit 100 %igem Ethanol gespült. Zum Färben der Kollagenfasern mussten die Schnitte für 60 Minuten in eine Saffron du Gatinais Lösung inkubieren. Im Anschluss daran erfolgte zweimal für je 4 Minuten die Entwässerung der Proben mit 96 %igem Ethanol sowie einer Inkubation der Schnitte über 5 Minuten in Xylol, bevor sie mit Entellan® eingedeckt werden konnten.

2.7.5.5 Elastica-Färbung

Eine weitere Möglichkeit elastische Fasern in der extrazellulären Matrix anzufärben, ist die Elastica-Färbung. Bei dieser Färbemethode färben sich die Zellkerne rot, die Kollagenfasern rosa und die elastischen Fasern blauviolett.

Zur Färbung von Paraffinschnitten mussten diese zuerst entparaffiniert und für 30 Minuten in eine auf 60 °C vorgewärmte Resochin-Fuchsin-Lösung zur Anfärbung der elastischen Fasern gestellt werden. Anschließend wurden die Proben mit VE-Wasser gewaschen, bis sich kein Resochin-Fuchsin mehr auswaschen lies. Als nächstes erfolgte die Differenzierung des Farbstoffes durch die Inkubation der Schnitte in einer HCl/Ethanol-Lösung unter ständiger Kontrolle der Schnitte unter einem Mikroskop, um festzustellen, ab welchem Zeitpunkt sich die extrazelluläre Matrix entfärbt hatte, die elastischen Fasern jedoch noch gefärbt waren. Dieser Schritt diente dazu eine Überfärbung der Schnitte auszuwaschen. Nach dem Differenzierungsschritt mussten die Proben zuerst 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser und danach mit VE-Wasser gewaschen werden. Zur Färbung der Zellkerne oder der DNA in der Matrix wurden die Schnitte 5 Minuten in Nuclear Fast Red inkubiert und anschließend so lange mit VE-Wasser gewaschen, bis das überschüssige Nuclear Fast Red entfernt war. Als nächstes durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe, bestehend aus zweimaligen Eintauchen in 50 %igen Ethanol sowie Inkubationen von zweimal je 2 Minuten in 96 %igen Ethanol und zweimal je 5 Minuten in Isopropanol, um die Schnitte zu Dehydrieren. Abschließend erfolgte eine zweimalige Inkubation der Schnitte für je 5 Minuten in Xylol und abschließendem Eindecken in Entellan®.

2.7.5.6 Immunhistochemische Färbung mit Diaminobenzidin

Proben, die eine geringe Dichte des anzufärbenden Zielantigens aufweisen, werden häufig immunhistologisch durch ein Nachweissystem mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt, da dieses System eine Verstärkung des Signales bewirkt. Der Nachweis der angefärbten Struktur erfolgt durch eine bräunliche Färbung des DABs, welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist.

Die Schnitte wurden für diese Färbemethode genauso entparaffiniert wie bei der H&E-Färbung. Nach der Entparaffinierung erfolgte die Antigendemaskierung auf den Präparaten durch das Kochen der Schnitte

für 20 Minuten in Citratpuffer mit anschließender Blockierung der zelleigenen Peroxidase durch eine Inkubation der Schnitte über 10 Minuten mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung sowie einem fünfminütigen Waschschrift mit Waschpuffer. Im Anschluss daran konnten die Schnitte mit dem Primärantikörper überschichtet und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper gliederten sich an die Inkubation 3 Waschschriffe von je 5 Minuten an. Als nächstes wurden auf jeden Schnitt zwei Tropfen des Polymer-Enhancer des Kits gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von 3 Waschschriffen von je 5 Minuten mit Waschpuffer. Im Anschluss erfolgte das Überschichten der Schnitte mit ca. 2 Tropfen des HRP-Polymers mit anschließender 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 3 Waschriffen von je 5 Minuten. Damit es zur Färbung der Zielantigene kam, mussten noch je zwei Tropfen des DAB Konzentrats auf die Präparate gegeben werden, um die Reaktion mit der Meerrettichperoxidase zu starten. Da die Färbereaktion der Meerrettichperoxidase sehr schnell abläuft, war es erforderlich die Färbung ständig visuell zu überwachen, damit es zu keiner Überfärbung der Probe kam. Zum Schluss der Färbung wurde noch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt bei der die Einwirkzeit des Hämatoxylins 30 Sekunden und die Dauer des Bläuens 90 Sekunden betrug. Abschließend durchliefen die gefärbten Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe gemäß der beschriebenen H&E-Färbung, damit die Schnitte mit Entellan® eingedeckt werden konnten.

2.7.5.7 Immunfluoreszenz-Färbung

Immunfluoreszenz-Färbungen eignen sich um verschiedene Antigene auf ein und demselben Schnitt anzufärben. Dabei ist darauf zu achten, dass die verschiedenen Primärantikörper in unterschiedlichen Spezies hergestellt sind, um eine falschpositive Färbung zu vermeiden. Ebenso sind Sekundärantikörper mit verschiedenen Fluorochromen einzusetzen, deren Anregungsspektren sich nicht überschneiden, damit eine eindeutige Lokalisation der angefärbten Struktur möglich ist.

Dazu mussten die Paraffinschnitte zuerst entparaffiniert und die Antigene durch das Kochen für 20 Minuten in Citratpuffer demaskiert werden. Im Anschluss an das Kochen erfolgt ein Blockierungsschritt von 20 Minuten mit einer Blockierlösung bestehend aus Antikörperverdünnungslösung mit 5 % Serum der Spezies, aus welcher der Sekundärantikörper stammt. Unmittelbar nach diesem Schritt wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper überschichtet, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für je 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach sind die Schnitte mit dem Sekundärantikörper, welcher ein Fluorochrom trägt, überschichtet und wiederum 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert worden. Da das Fluorochrom durch UV-Licht angeregt wird und somit ein

Verbleiben des Fluorchroms durch das Tageslicht möglich ist, erfolgte ab diesem Schritt das weitere Vorgehen im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Proben dreimal 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und abschließend mit MOWIOL DABCO, welchem 0,1 % DAPI zugefügt war, eingedeckt.

2.7.5.8 Aufnahme Assay von acetyliertem Low Density Lipoprotein

Nicht nur fixierte und eingebettete Proben können mittels Fluoreszenzen angefärbt werden. Es ist auch möglich sowohl lebende Zellen als auch lebende Gewebe mit Fluorchromen anzufärben. Dies wird häufig bei Assay zur Funktionalität durchgeführt. Solch ein Test ist der Aufnahmetest von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), welches mit einem Fluorchrom gekoppelt ist.

Für die Durchführung des Tests wurde das Gewebe in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Nährmedium überschichtet, welches 1 μ l/ml Low Density Lipoprotein von humanem Plasma, konjugiert mit Alexa Fluor[®] 488 (Life technologies) sowie 10 μ l/ml Hoechst (Life technologies) zum Anfärben der Zellkerne enthielt. Die Inkubation des Ansatzes betrug 1 Stunde unter physiologischen Bedingungen sowie unter Ausschluss von Licht. Zur Auswertung des Tests erfolgte die Aufnahme von Bildern mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica.

2.7.6 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Begutachtung der Morphologie beziehungsweise der Ausrichtung der elektrogewebenen Fasern in den Matrices wurden Bilder der Matrices mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen. Dazu mussten die Matrices bei einer Stromstärke von 20 mA für 30 Sekunden mit Platin besputtert werden. Die Vorbereitung der Proben und das Erstellen und die Durchführung der Aufnahme von den Präparaten erfolgte am Fraunhofer-Institut für Silicatforschung (ISC) in Würzburg.

3 Ergebnisse

3.1 Dezellularisierung von Gewebe

Das Tissue Engineering beschäftigt sich mit dem Aufbau von Geweben, welche als Testsysteme oder als Implantate zur Anwendung kommen. Solch funktionelle Gewebeäquivalente müssen eine gewisse Dicke aufweisen. Deshalb wird als Grundlage für den Aufbau des Gewebes auf dreidimensionale Matrizes zurückgegriffen. Wenn bestimmte Strukturen des Gewebes, beziehungsweise die natürliche Umgebung der Zellen oder die eines Gefäßsystem bereits in der Matrix enthalten sein sollen, werden häufig dezellularisierte Gewebe eingesetzt.

3.1.1 Dezellularisierung von porzinem Darm (SISser)

Ein Gewebe, welches sich als Matrix für das Tissue Engineering eignet, ist ein Segment des Jejunums des Schweinedarms, da dieses Gewebe ein Kollagengerüst enthält welches mit Blutgefäßen durchzogen ist. Zur Verwendung des Schweinedarms als Matrix muss dieser zuerst dezellularisiert werden. Als Qualitätskontrolle und zum Nachweis der Zellfreiheit der Darmstücke wurden eine H&E- Färbung sowie eine Färbung nach Feulgen durchgeführt (Abbildung 7).

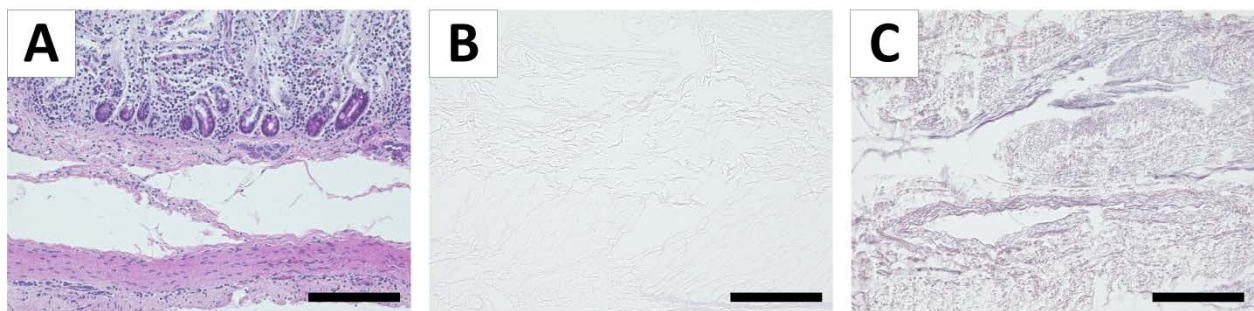


Abbildung 7: Dezellularisierter porziner Darm (SISser).

Zum Nachweis der Zellfreiheit der SISser wurden eine H&E-Färbung sowie eine Färbung nach Feulgen durchgeführt. Die H&E-Färbung des nativen Schweinedarms zeigt ein mit Zellen dicht besiedeltes Gewebe (A), nach der Dezellularisierung sind keine verbleibenden Zellkerne in der Matrix nachweisbar (B). Dieses Ergebnis wird von der Färbung nach Feulgen bestätigt (C), da mit dieser Färbung keine verbleibende DNA in der Matrix nachgewiesen werden konnte. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μm .

Mit der H&E-Färbung waren keine Zellkerne in der dezellularisierten Matrix nachweisbar, was darauf hinweist, dass die Zellen vollständig aus der Matrix entfernt wurden. Zur Bestätigung des Ergebnisses der

H&E-Färbung wurde eine Färbung nach Feulgen durchgeführt, wobei die verbleibende DNA in der Matrix rot-violett angefärbt wird. Auch mittels der Färbung nach Feulgen konnte keine verbleibende DNA in der Matrix nachgewiesen werden, was ebenfalls die Zellfreiheit der Matrix hindeutet.

3.1.2 Dezellularisierungswand

Zum Erhalt vergleichbarer Ergebnisse beim Wiederaufbau von Geweben, unter dem Einsatz von biologischen Matrices, ist ein standardisiertes Dezellularisierungsverfahren nötig. Damit dies gewährleistet ist, wurde eine druckgesteuerte Dezellularisierungswand entwickelt, mit welcher native Gewebe über deren Gefäßsystem dezelluliert werden können.

3.1.2.1 Aufbau der Dezellularisierungswand

Für die Planung und Konstruktion des Aufbaus der Dezellularisierungswand wurde das 3D-CAD Programm SolidWorks der Firma Dassault Systèmes eingesetzt. Das Gerüst der Dezellularisierungswand besteht aus Profilen der Firma item Industrietechnik GmbH. Die Zwischenräume der Profile sind mit Kunststoffplatten ebenfalls von der Firma item Industrietechnik GmbH verkleidet. An der Vorderseite der Wand sind insgesamt fünf Rollerpumpen fest installiert. Jede dieser Rollerpumpen bietet Aufsteckplätze für vier Pumpschläuche. Somit stehen insgesamt 20 Steckplätze für Pumpschläuche zur Verfügung. Auf der oberen Seite der Dezellularisierungswand sind die Touchscreens für die Eingabe des Solldruckes angebracht. Die Dezellularisierungswand hat die Abmessungen von 285 cm Länge, 40 cm Höhe und 28 cm Tiefe (Abbildung 8). Sie ist somit so bemessen, dass sie von der Länge her auf die Arbeitsfläche der Labortischzeile passt und von der Tiefe die Hälfte des Tisches einnimmt. Alle Pumpen sind im gleichmäßigen Abstand voneinander angebracht. Dadurch ist vor, beziehungsweise neben den Pumpen, genügend Platz für das Aufstellen der Gefäße für den Dezellularisierungsprozess vorhanden.



Abbildung 8: Dezellularisierungswand

Die Dezellularisierungswand ist mit Aluminiumprofilen und Verkleidungselementen der Firma item Industrietechnik GmbH aufgebaut. In der Anlage sind fünf Rollerpumpen in immer gleichem Abstand zueinander fest verbaut. Gesteuert werden die Pumpen durch die Steuerung ET200S der Firma Siemens AG. Der Betrieb der Dezellularisierungswand kann mit konstanter Drehzahl oder druckgesteuert mit einem pulsativen Druckprofil erfolgen. Die Regelung der Drehzahl bei druckgesteuerten Betrieb ist über Regelkreise in der Steuerung realisiert. Dabei wird der von den Sensoren erfasste Ist-Druck mit dem eingegebenen Soll-Druck abgeglichen. Zur Eingabe der Parameter für den Betrieb der Pumpen sind zwei Touch Panels eingebaut.

3.1.2.2 Steuerung der Dezellularisierungswand

Für die Steuerung der Pumpe der Dezellularisierungswand wird die Steuerung ET200S von Siemens eingesetzt. Die Komponenten, aus denen die Steuerung besteht, sind die CPU, ein Powermodul, fünf Kommunikationsmodule mit einer seriellen Schnittstelle und drei Analogeingangsmodulen für Spannung. Das Powermodul versorgt die anderen Module mit Strom. Jede der Pumpen wird mit einem Kommunikationsmodul mit serieller Schnittstelle angesteuert. Dafür wandeln die Analogeingangsmodule die Druckmesswerte von analog in digital um. Dabei können je zwei Pumpen auf ein Kommunikationsmodul geklemmt werden. Mit Hilfe dieser Steuerung ist es möglich die Pumpen zum einen mit einer konstanten Drehzahl zu betreiben, zum anderen in Abhängigkeit des im Pumpsystem herrschenden Drucks. Dafür kann ein bestimmter Arbeitsdruck über das Bedienpanel eingegeben werden. Über den Abgleich des im System herrschenden Drucks mit dem eingestellten Arbeitsdruck wird via eines Regelkreises die Drehzahl der Pumpe geregelt, so dass der eingegebene Arbeitsdruck immer konstant im System vorherrscht (Abbildung 9).

Der Aufbau der Steuerung ist in folgendem Datenflussdiagramm dargestellt:

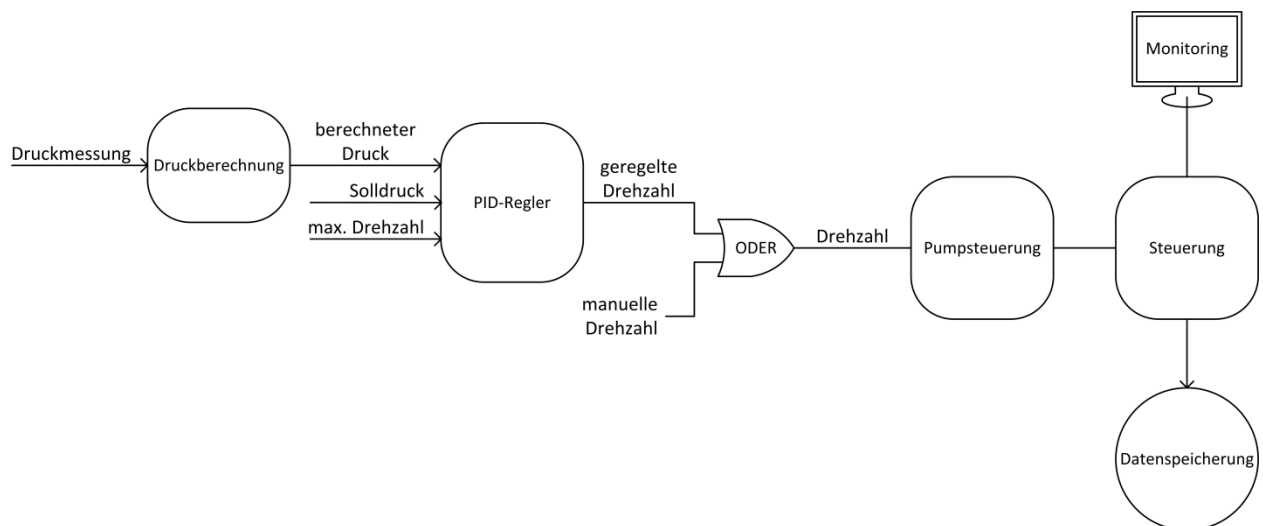


Abbildung 9: Datenflussdiagramm der Dezellularisierungswand

Das Diagramm zeigt den Ablauf der Datenverarbeitung bei der Dezellularisierungswand durch die Steuerung. Der eingegebene Soll-Druck wird ständig durch Regelkreise mit dem Ist-Druck abgeglichen und die Drehzahl dementsprechend angepasst. Des Weiteren ist es möglich eine konstante Drehzahl, unabhängig vom Druck, einzugeben.

3.1.3 Dezellularisierung von porzinem Herz

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit und Optimierung der Dezellularisierungswand sowie des Dezellularisierungsprozesses wurden 20 intakte Schweineherzen dezellularisiert. Die Dezellularisierung der porzinen Herzens erfolgte per retrograder Perfusion unter einem konstanten Druck von 80 mmHg. Im 24-Stunden-Rhythmus wurde zwischen PBS und Dezellularisierungslösung als Perfusat gewechselt. Mit fortschreitendem Dezellularisierungsgrad der Matrix erhöhte sich die Drehzahl der Pumpe, damit der eingestellte Druck von 80 mmHg gehalten werden konnte. Da ein explantiertes Herz nicht dem anderen entspricht, waren die Anfangsdrehzahlen, mit der die Pumpe zu Beginn der Dezellularisierung betrieben wurde unterschiedlich und lagen in einem Intervall von 10 U/min bis 100 U/min. Am Ende des Prozesses lief die Pumpe immer mit einer Drehzahl von 240 U/min, was der Maximaldrehzahl entspricht.

Tabelle 6: Dezellularisierungsgrad verschiedener Bereiche des Herzens

Herz	Dezellularisierungsgrad			
	rechter Ventrikel	linker Ventrikel	Septum	Herzspitze
1	80 %	0%	0 %	0 %
2	90 %	0 %	0 %	0 %
3	90 %	0 %	0 %	0 %
4	100 %	5 %	20 %	10 %
5	100 %	10 %	60 %	30 %
6	100 %	30 %	80 %	50 %
7	100 %	50 %	90 %	70 %
8	100 %	80 %	100 %	90%
9	100 %	80 %	100 %	90%
10	100 %	80 %	100 %	90%
11	100 %	90 %	100 %	100 %
12	100 %	90 %	100 %	100 %
13	100 %	90 %	100 %	100 %
14	100 %	100 %	100 %	100 %
15	100 %	100 %	100 %	100 %
16	100 %	100 %	100 %	100 %
17	100 %	100 %	100 %	100 %
18	100 %	100 %	100 %	100 %
19	100 %	100 %	100 %	100 %
20	100 %	100 %	100 %	100 %

Der Erfolg der Dezellularisierung und somit die Zellfreiheit der Matrix wurde mittels histologischer Färbungen nachgewiesen. Zur Überprüfung des Verbleibs von DNA in der Matrix wurde eine Feulgen-Färbung durchgeführt. Für den Nachweis des Erhalts der Kollagenfasern wurde eine Pentachromfärbung gemacht und um zu prüfen ob noch elastische Fasern in der Matrix verblieben sind wurde eine Elastica-Färbung durchgeführt. Zusätzlich wurde auch eine H&E-Färbung durchgeführt um die Morphologie der Matrix und den Verbleib von Zellkernresten in der Matrix zu überprüfen. In Abbildung 10 sind die oben genannten Färbungen der dezellularisierten Schweineherzen dargestellt. Die Dezellularisierung dieser Herzen erfolgte mit der optimierten Dezellularisierungswand sowie dem

optimierten Prozess. In Tabelle 6 ist die Zunahme des Dezellularisierungsgrades der verschiedenen Bereiche des Herzens über den Entwicklungsprozess aufgelistet.

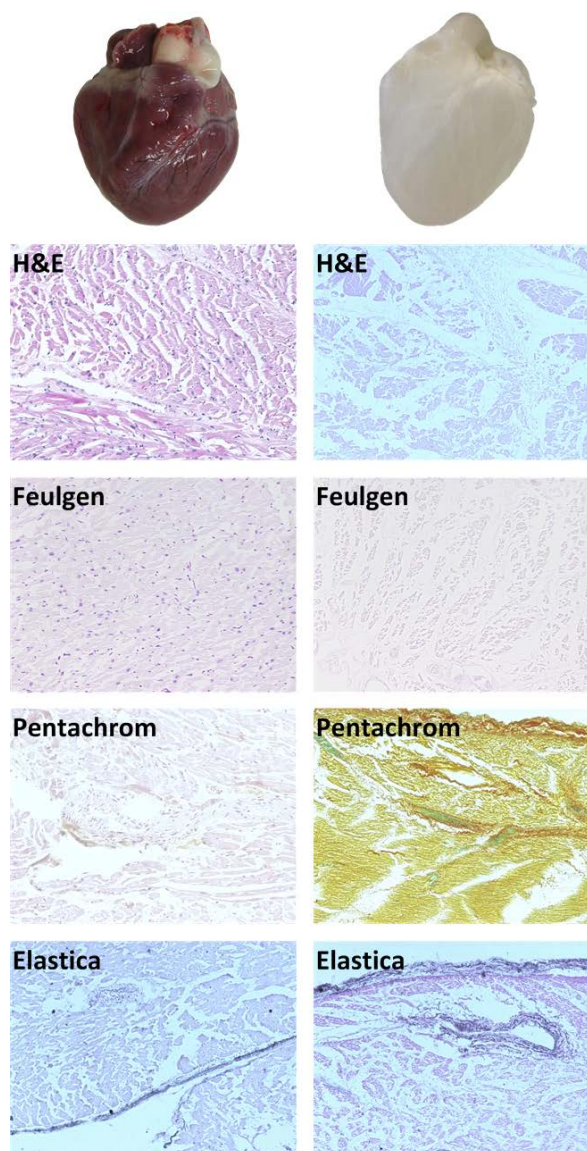


Abbildung 10: Charakterisierung dezellularisiertes Schweineherz

Die Matrix eines dezellularisierten Schweineherzes ist weiß. Zur Charakterisierung der Matrix und zum Nachweis der Zellfreiheit wurden verschiedene histologische Färbung am nativen Herzgewebe und der dezellularisierten Matrix durchgeführt. Anhand der H&E Färbung lässt sich im Vergleich zu einem nativen Schweineherz kein Unterschied hinsichtlich der Morphologie der Matrix erkennen. Ebenso zeigt die Färbung keine verbliebenen Zellkernreste in den Matrizes der dezellularisierten Schweineherzen. In der Feulgen-Färbung ist kein Verbleib von DNA (rotviolette Färbung) zu beobachten. Die Pentachrom-Färbung zeigt den Verbleib von Kollagenfasern (gelbliche Färbung) in der Matrix nach dem Dezellularisierungsprozess. Ebenso können elastische Fasern (blau) durch die Elastica-Färbung in den zellfreien Matrizes nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum nativen Herzgewebe erscheint die dezellularisierte Herzmatrix weiß. Für die Charakterisierung und dem Nachweis der Zellfreiheit, wurden verschiedene histologische Färbungen durchgeführt. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Dezellularisierungsprozesses auf die Morphologie der Matrix und einen Verbleib von Zellkernresten in der Matrix, wurde eine H&E Färbung durchgeführt. Bei den dezellularisierten Scaffolds sind keine dunkelblau gefärbten Zellkernreste zu erkennen. Ebenso ist kein Unterschied in der Morphologie im Vergleich zu der nativen Matrix auszumachen. Des Weiteren wurde eine Feulgen-Färbung durchgeführt, um zu prüfen, ob Reste von DNA im dezellularisierten Gewebe verblieben sind. Mit dieser Färbung konnte keine DNA nachgewiesen werden, was durch eine fehlende rotviolette Färbung der Schnitte erkennbar ist. Wichtig ist beim Dezellularisieren von Geweben, dass die Kollagenfasern in der Matrix verbleiben. Als Nachweis für den Verbleib der Kollagenfasern wurde eine Pentachromfärbung durchgeführt, welche diese Fasern gelblich und Muskelgewebe rot anfärbt. Bei den dezellularisierten Geweben ist ein Verbleib der Kollagenfasern durch die gelbliche Färbung erkennbar. Das Schweineherz 1 zeigt eine gelbliche Färbung der kompletten Matrix, was darauf schließen lässt, dass die Kollagenfasern durch den Dezellularisierungsprozess nicht zerstört und ausgespült worden sind. Die anderen Herzen hingegen weisen nur wenige Stellen mit einer gelblichen Färbung auf. Daher kann man davon ausgehen, dass der Prozess bei diesen Präparaten nicht optimal war. Keines der dezellularisierten Schweineherzen zeigt bei der Pentachrom-Färbung die markante rote Färbung für Muskelgewebe. Weitere wichtige Fasern in einem Gewebe sind die elastischen Fasern. Diese können mit der Elastica-Färbung blau angefärbt werden. Bei den zellfreien Schweineherzen sind diese ebenso wie bei dem nativen Herz gut an der Oberfläche der Matrix und um die Gefäße herum zu erkennen.

3.2 Elektrospinning

Eine Alternative zu den dezellularisierten Geweben ist ein künstlich, durch verschiedene Verfahren hergestelltes Scaffold. Solche Matrizes werden eingesetzt, wenn nicht ausreichend natives Gewebe für den Dezellularisierungsprozess vorhanden ist. Ein Verfahren, welches sehr häufig eingesetzt wird, wenn Matrizes im Nanofaserbereich hergestellt werden sollen, ist das Elektrospinning. Mit diesem Verfahren können standardisierte Nanofasermatten mit gerichteten, parallelen Fasern aber auch mit willkürlich angeordneten Fasern erzeugt werden.

3.2.1 Elektrospinning-Apparatur

Die Elektrospinning-Apparatur wurde aus Aluminiumprofilen der Firma item Industrietechnik GmbH aufgebaut. Sie wurde als ein mobiles Stand-Alone-System (Abbildung 11A) designt und kann somit in jeden Raum mit einer Absaugvorrichtung verschoben werden. Insgesamt hat die Anlage eine Länge von 1660 mm, eine Höhe von 1550 mm und eine Tiefe von 800 mm, wobei der Raum in dem das Spinning durchgeführt wird die Abmessungen von 1660 x 600 x 800 mm hat.

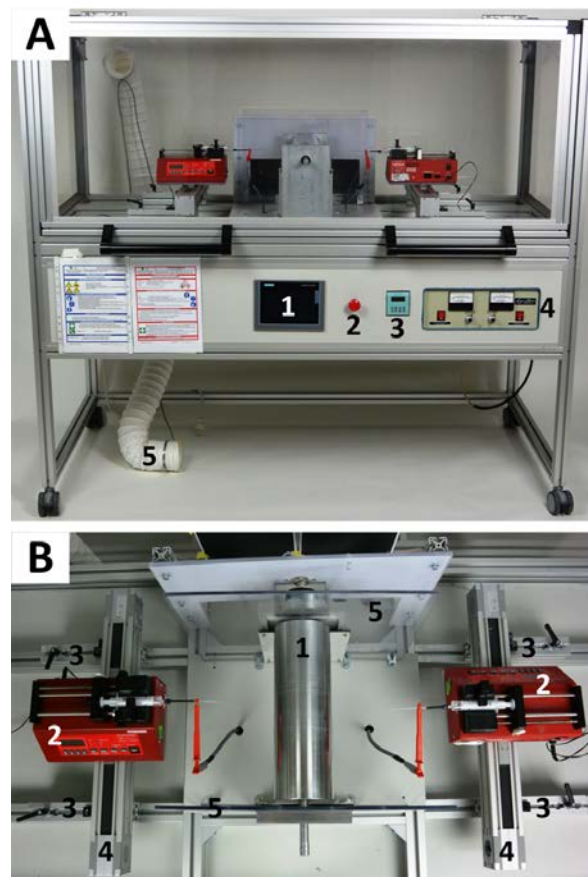


Abbildung 11: Elektrospinningeinheit

(A) Die Elektrospinninganlage ist als ein mobiles Stand-Alone-System konzipiert. Sie ist aus Profilen und Abdeckelementen der Firma item Industrietechnik GmbH aufgebaut. Unter dem Prozessraum sind ein Touchpanel zur Pumpensteuerung (1), ein Not-Aus-Schalter (2), das Bedienpanel (3) für den Motor zum Antrieb der Welle (Kollektorelektrode) und ein Hochspannungsgenerator (4) eingebaut. Des Weiteren ist ein Schlauch zum Entlüften des Prozessraumes an der hinteren Scheibe angebracht (5). (B) Im Prozessraum sind die Welle (1), welche als Kollektorelektrode dient sowie die beiden Spritzenpumpen (2) installiert. Der Abstand der Pumpen zur Welle kann durch ein Schienensystem (3) variiert werden. Die Pumpen sind auf Lineareinheiten (4) montiert, was das Verschieben der Pumpen nach rechts und links ermöglicht. Seitlich der Welle sind Schilde (5) aus Polycarbonat angebracht, um den Polymer-Jet im Bereich der Welle zu halten.

Der Motor für den Antrieb der Welle, welche ebenfalls als Kollektorelektrode dient, sowie die Spannungsquelle zur Erzeugung des elektrischen Feldes, sind auf einer Etage unter dem Prozessraum angebracht. Die Einstellung der Spannung erfolgt direkt am Hochspannungsgenerator mittels eines Drehknopfes. Für die Einstellung der Drehzahl des Motors ist ein Bedienpanel angebracht. Da während des Spinningprozesses das Lösungsmittel der Polymerlösung verdampft und diese Gase auch giftig oder gesundheitsschädlich sein können, wurde ein Schlauch an den Prozessraum angebracht, um die Lösungsmitteldämpfe aus dem Prozessraum durch eine Absaugung zu entfernen. Des Weiteren ist ein Touchpanel verbaut, welches zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt die computergestützte Steuerung der Pumpen ermöglichen soll.

Im Prozessraum der Elektrosinninganlage (Abbildung 11B) ist zentral die Welle, welche als Kollektorelektrode fungiert, durch zwei Halter fixiert. Diese Welle ist durch zwei Isolationskugellager drehbar gelagert und über einen Riemen mit dem Motor verbunden. Rechts und links der Welle ist jeweils eine Spritzenpumpe auf einem Schienensystem angebracht. Durch das Schienensystem können die Pumpen weiter von der Welle entfernt oder näher zu ihr geschoben werden, wodurch der Abstand Emitter- und Kollektorelektrode variiert werden kann. Seitlich der Welle sind zwei Schilde aus Polycarbonat angebracht, um den Jet der Polymerlösung im Bereich der Rolle zu halten. Mit Hilfe des Motors und der Übersetzung durch die Riemenscheiben am Motor und der Welle kann die Welle mit einer Geschwindigkeit von minimal 32 km/h bis zu einer Maximalgeschwindigkeit von 62 km/h betrieben werden. Da der Durchmesser der Rolle 100 mm beträgt ergibt sich daraus eine Drehzahl von ca. 1616 U/min bis zu ca. 3131 U/min.

3.2.2 Generierung gerichteter Matrizes

Für die Erzeugung von Matrizes mit parallel ausgerichteten Fasern wurden Lösungen aus verschiedenen Polymerkonzentrationen beziehungsweise aus Polymerkombinationen hergestellt. Zur Herstellung der Polymerlösungen kamen die Lösungsmittel Hexafluorisopropanol und Chloroform zum Einsatz. Damit die Fasern in den Matrizes parallel angeordnet werden konnten, diente eine sich mit 1616 U/min drehende Walze als Kollektorelektrode. Der Abstand der Emitter- zur Kollektorelektrode wurde für alle Spinnprozesse auf 100 mm eingestellt. Die Pumprate der Polymerlösungen betrug für alle Ansätze 0,4 ml/h. In Tabelle 7 sind die Parameter aller gesponnenen Matrizes aufgelistet. Diese Matrizes werden in den folgenden Teilen auf ihre Tauglichkeit für den Einsatz im kardialen Tissue Engineering untersucht.

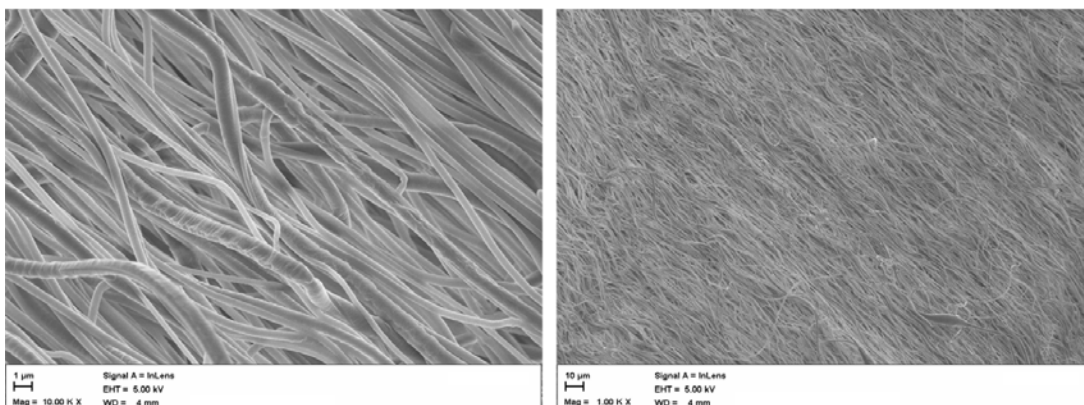
Tabelle 7: Überblick elektrogenesponnene Matrices

Polymere in Lösung	Lösungsmittel	Faserdicke	angelegte Spannung [kV]	n
10 % Polycaprolacton	HFP	< 1 μm	7	3
15 % Polycaprolacton	HFP	$\leq 1 \mu\text{m}$	7	3
20 % Polycaprolacton	HFP	> 1 μm	10	3
10 % Polycaprolacton	Chloroform	0,3 μm – 4 μm	5	3
15 % Polycaprolacton	Chloroform	0,5 μm – 3 μm	7	3
20 % Polycaprolacton	Chloroform	1 μm – 4 μm	10	3
12 % ige Lösung aus 3 Teilen PCL und 1 Teil Gelatine	HFP	0,05 μm – 8 μm	7	3
15 % Polycaprolacton mit 1 % pulverisierte, porzine Herzmatrix	HFP	0,3 μm – 1 μm	10	3

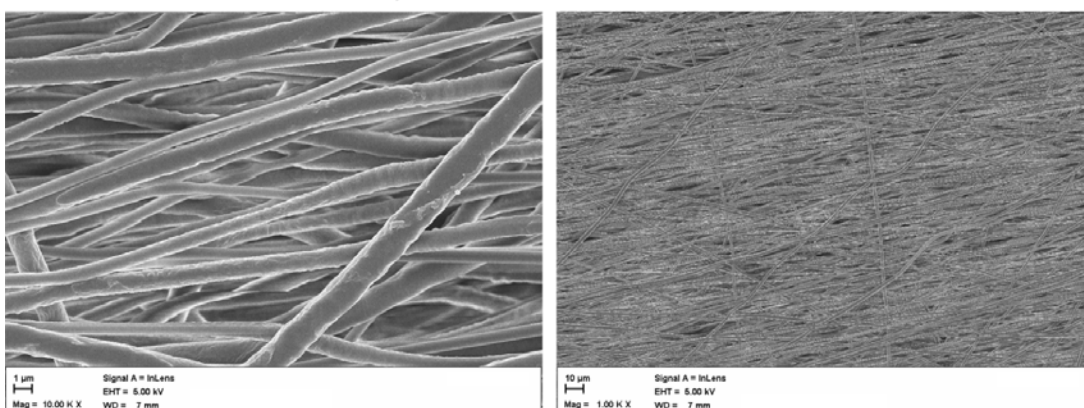
3.2.2.1 Morphologie der Matrices

Da die Anordnung der Kollagenfasern in den verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich ist, sollten Matrices mit der gleichen Faserorientierung, wie sie im nativen Herz vorliegt, erstellt werden. Das Herz besteht aus Muskelgewebe, in dem sich die Zellen parallel zueinander anordnen und Muskelfasern bilden. Daher sind die Kollagenfasern im Herz auch parallel zueinander angeordnet. Aus diesem Grund sollte die Anordnung der gesponnenen Fasern auch dieser Ausrichtung entsprechen. Zur Begutachtung der Morphologie der gesponnenen Polymerfasermatten wurden deshalb rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Scaffolds angefertigt.

Polymerkonzentration: 10 %



Polymerkonzentration: 15 %



Polymerkonzentration: 20 %

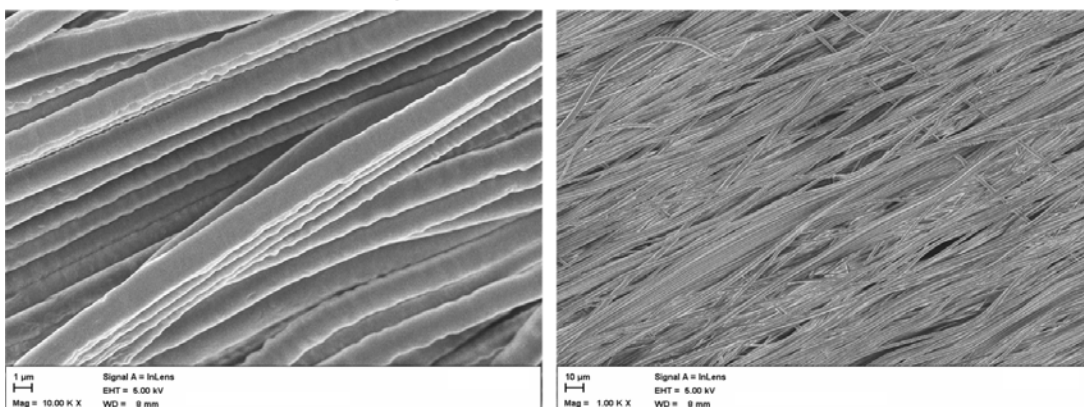


Abbildung 12: Polycaprolacton-Matrizes gesponnen aus Hexafluorisopropanol.

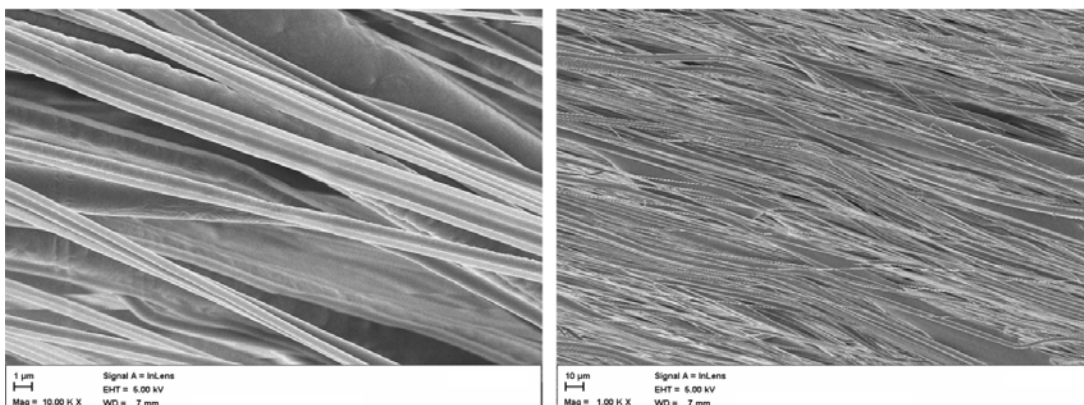
Lösungen aus Polycaprolacton (PCL) wurden in den Konzentrationen 10 %, 15 % und 20 % hergestellt. Als Lösungsmittel wurde Hexafluorisopropanol (HFP) eingesetzt. Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass der Durchmesser der Fasern sowie die Homogenität der Faserdicke mit steigender Polymerkonzentration zunehmen. Ebenso kann beobachtet werden, dass sich dickere Fasern besser parallel zueinander ausrichten lassen.

Für die Produktion der Matrizes (Abbildung 12) wurde Polycaprolacton (PCL) in Hexafluorisopropanol (HFP) gelöst. Es wurden eine 10 %ige, eine 15 %ige sowie eine 20 %ige Polymerlösung hergestellt. Zum Verspinnen der Lösungen wurde für die Lösungen mit 10 % und 15 % eine Spannung von 7 kV und für die Lösung mit 20 % eine Spannung von 10 kV angelegt. Damit sich die Fasern parallel zueinander orientiert anlagern, wurde die Kollektorelektrode mit einer Drehzahl von ca. 1616 U/min betrieben. Als Emittierelektrode wurde für alle Lösungen eine Metallkanüle mit einem Außendurchmesser von 18 G eingesetzt. Diese Parameter wurden für alle Spinnvorgänge (n=3) der drei unterschiedlichen Konzentrationen beibehalten.

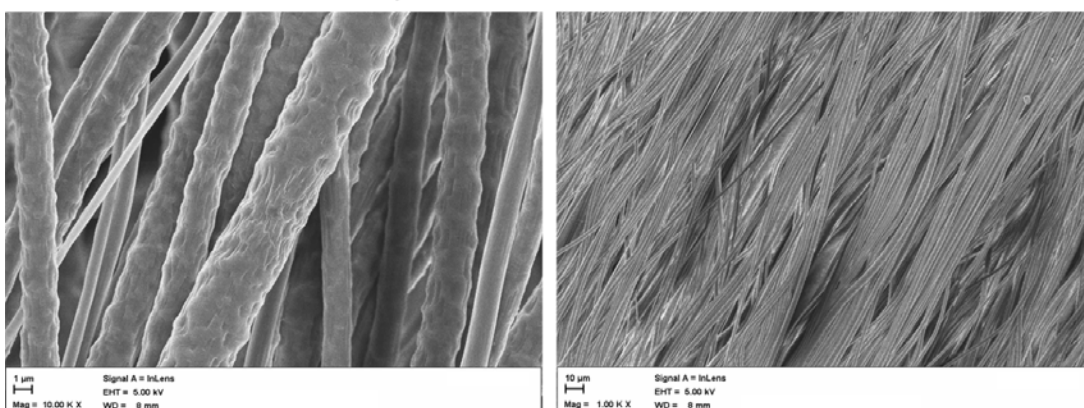
Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zeigen, dass der Faserdurchmesser mit steigender Polymerkonzentration größer wird. Bei der Lösung mit 10 % PCL liegt der Faserdurchmesser noch im Nanometerbereich, wohingegen der Durchmesser bei der Lösung mit 20 % PCL mehr als einen Mikrometer beträgt. Ebenfalls lässt sich auf den Aufnahmen erkennen, dass die Homogenität der Faserdicke mit ansteigender Lösungskonzentration zunimmt. Weiterhin kann beobachtet werden, dass sich die Fasern, je dicker deren Durchmesser ist, zunehmend parallel auf der Kollektorelektrode ausrichten.

Das gleiche Experiment wurde nochmals unter Verwendung eines anderen Lösungsmittels durchgeführt. Anstatt von HFP wurde Chloroform verwendet, die Konzentrationen des PCL wurden beibehalten. Die Spannungen für den Spinnprozess wurden für die jeweilige Lösungskonzentration ebenfalls beibehalten.

Polymerkonzentration: 10 %



Polymerkonzentration: 15 %



Polymerkonzentration: 20 %

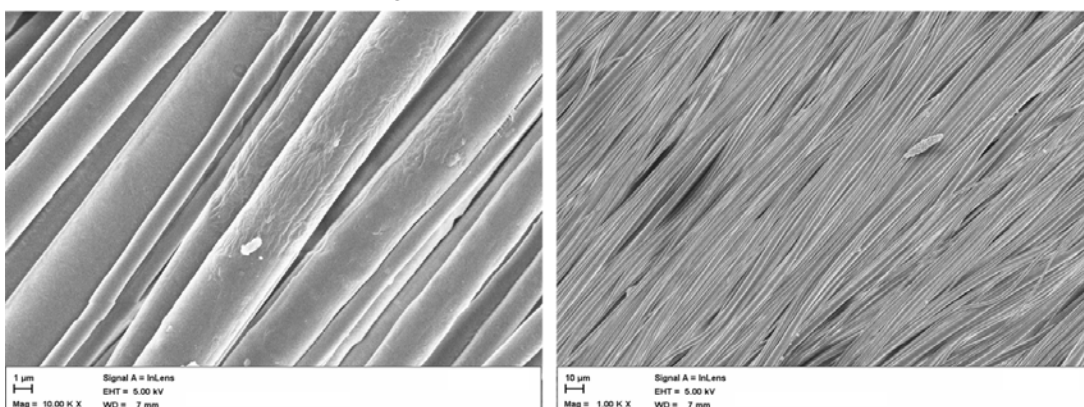


Abbildung 13: Polycaprolacton-Matrizes gesponnen aus Chloroform.

Es wurden Lösungen der Konzentrationen 10 %, 15 % und 20 % aus PCL hergestellt. Als Lösungsmittel diente Chloroform. Mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen ist erkennbar, dass der Durchmesser der Fasern mit steigender Polymerkonzentration zunimmt. Das Spektrum der Faserdurchmesser engt sich mit steigender Konzentration des PCL in der Lösung ein. Mit ansteigendem Faserdurchmesser nimmt auch der Grad der parallelen Orientierung der Fasern zueinander zu.

Die Fasern der Matrizes, welche aus dem Lösungsmittel Chloroform gesponnen wurden (Abbildung 13), verhalten sich analog zu den Fasern, welche aus HFP gesponnen wurden. Der Faserdurchmesser nimmt mit steigender Polymerkonzentration zu. Bei einer Konzentration von 10 % liegen die Fasern im Nanometerbereich, wohingegen die Fasern, gesponnen aus der Lösung mit 20 % Polymeranteil, einen Durchmesser von ein paar Mikrometern erreichen. Ebenso wird die Variation zwischen den einzelnen Faserdurchmessern mit steigendem PCL Gehalt in der Lösung geringer. Es lässt sich des Weiteren beobachten, dass die Fasern, je höher die Polymerkonzentration ist, eine Anordnung mit höherer Parallelität einnehmen. Alle Spinningprozesse der verschiedenen Lösungen sind 3-mal durchgeführt worden.

Vergleicht man die Fasern bei denen HFP als Lösungsmittel verwendet wurde mit den Fasern die aus Chloroform gesponnen wurden, so erkennt man trotz der gleichen Tendenzen einige Unterschiede. So sind die Fasern welche aus HFP gesponnen wurden, bei gleicher Polymerkonzentration im Mittel dünner als die, bei denen Chloroform als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Ebenfalls führt der Einsatz von HFP als Lösungsmittel zu einer höheren Homogenität der Faserdurchmesser innerhalb einer bestimmten Polymerkonzentration. Ein weiterer Unterschied zwischen den Matrizes, welche mit den unterschiedlichen Lösungsmitteln gesponnen wurden ist, dass die Fasern aus dem PCL, welches mit Chloroform gelöst wurde, eine Ausrichtung mit höherer Parallelität innerhalb des gleichen Konzentrationslevels der Polymerlösung aufweisen.

Zur Stimulierung der Zellen, die auf den Matrizes kultiviert werden sollen und um ihnen eine naturgetreuere Umgebung zu geben, wurden auch Kombinationskonstrukte aus einer Lösungen bestehend aus PCL und Gelatine (Abbildung 14) sowie einer 15 % PCL-Lösung, welche pulverisierte, porcine Herzmatrix enthielt (Abbildung 15), hergestellt.

12 %ige Polymerlösung: aus 3 Teilen PCL und 1 Teil Gelatine

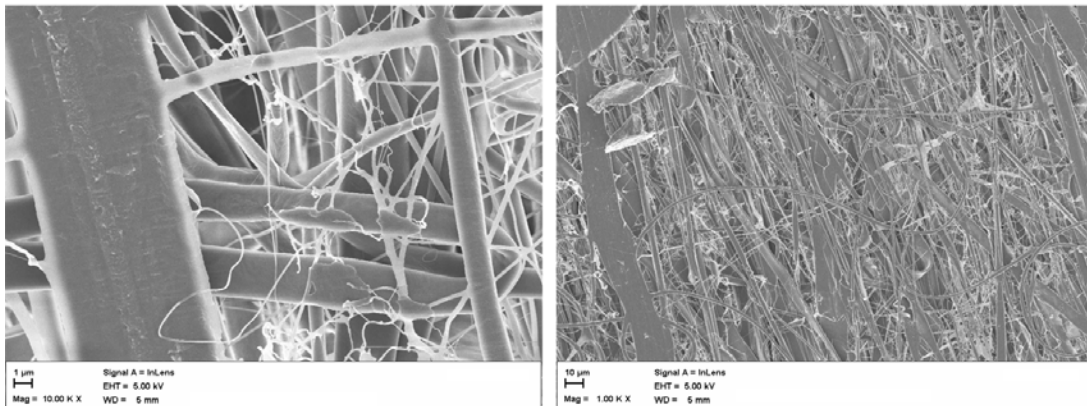
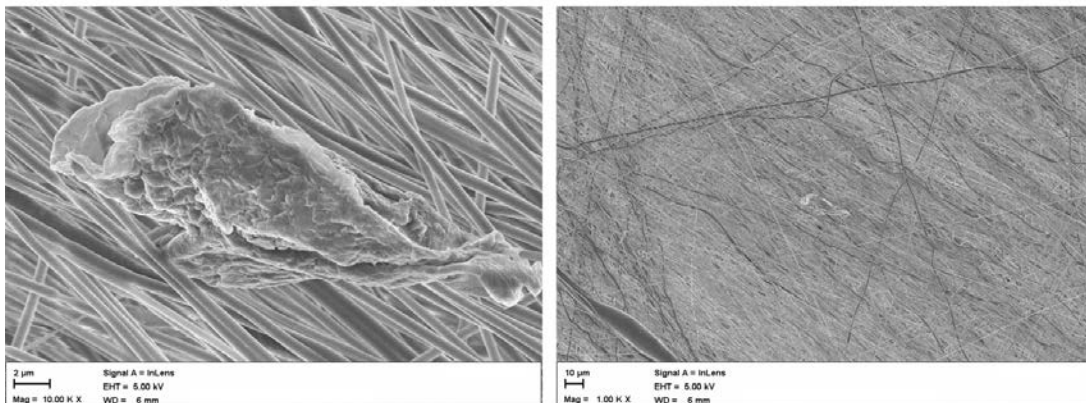


Abbildung 14: Kombinationsmatrix aus PCL und Gelatine

Das Scaffold, gesponnen aus einer 12 %igen Lösung bestehend drei Teilen PCL und einem Teil Gelatine, gelöst in HFP, weist Fasern mit den verschiedensten Durchmessern auf. Die Fasern sind nicht einheitlich parallel zueinander ausgerichtet, sondern liegen in beliebiger Anordnung vor. Dies trifft insbesondere auf die Fasern im Nanometerbereich zu. Der Faserdurchmesser bewegt sich in einem Bereich von mehreren Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern.

Die Aufnahmen der 12 %igen Lösung bestehend drei Teilen PCL und einem Teil Gelatine, welche in HFP gelöst wurden, zeigen eine große Anzahl verschiedenster Faserdurchmesser, beginnend bei mehreren Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern. Des Weiteren ist zu erkennen, dass sich die Fasern, welche einen Durchmesser im Mikrometerbereich haben, überwiegend parallel zueinander angeordnet haben. Dahingegen liegen die Fasern mit einem Durchmesser von mehreren Nanometern in einer chaotischen Anordnung vor. Für den Spinnprozess wurde als Emittierelektrode eine 18 G Kanüle verwendet, an die eine Spannung von 7 kV angelegt wurde.

15 %ige PCL-Lösung mit 1 % pulverisierte, porcine Herzmatrix



pulverisierte, porcine Herzmatrix

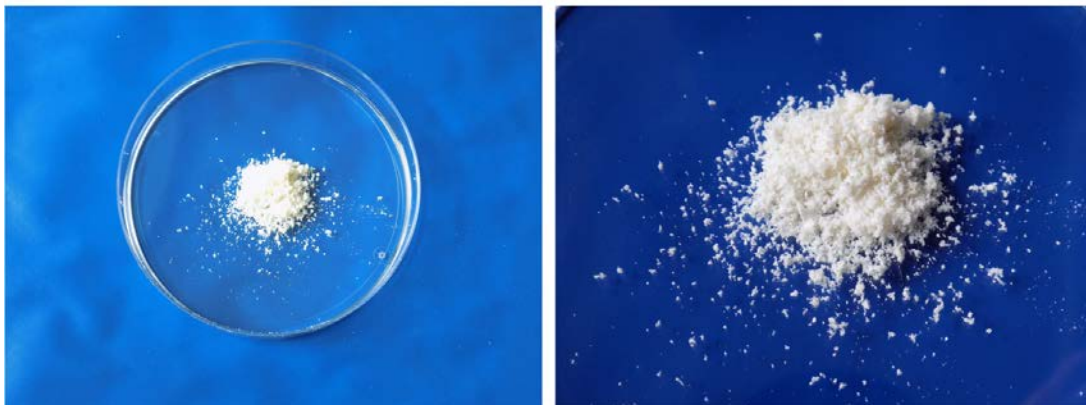


Abbildung 15: Kombinationsmatrix aus PCL und pulverisierter Herzmatrix

Bei der Matrix, generiert aus einer 15 %igen Lösung bestehend aus PCL gelöst in HFP und 1 % pulverisierter, porciner Herzmatrix, bewegt sich der Faserdurchmesser im Nanometerbereich. Die Pulverkörner der Herzmatrix, welche größer als der Faserdurchmesser sind, sind von den Fasern umgebend in die Matrix eingebettet. Es sind jedoch nur wenige der Herzmatrixstücke in dem Scaffold aufzufinden. Eine größtenteils parallele Ausrichtung der Fasern ist zu erkennen. Die beiden unteren Bilder zeigen das Aussehen der pulverisierten, porcinen Herzmatrix.

Eine weitere Möglichkeit für eine Kombination von mehreren Komponenten ist das Einspinnen von Pulverpartikeln in die Matrix. Dazu wurde das Pulver einer dezellularisierten, porcinen Herzmatrix in eine 15 %ige Lösung aus PCL, gelöst in HFP gemischt. Das Pulver nahm einen Gewichtsanteil von 1 % ein. Die Pulverpartikel sind von den Fasern umlagert und somit in der Matrix eingebettet. Der Durchmesser der Gesamtheit der Fasern ist annähernd identisch und liegt in einem Bereich von ein paar hundert Nanometern. Es ist erkennbar, dass sich der überwiegende Anteil der Fasern parallel zueinander angeordnet hat. Aufgrund der in der Lösung enthaltenen Pulverpartikel ist für den Spinnvorgang eine

17 G Kanüle als Emittierelektrode verwendet worden. Damit während des Prozesses ein kontinuierlicher Jet zustande kam, musste eine Spannung von 10 kV angelegt werden.

3.2.2.2 Zellkultur auf den Matrizes

Zur Bewertung, ob die elektrogesponnenen Matrizes für den Einsatz im Tissue Engineering in Frage kommen, wurden diese mit Zellen, welche aus einer Biopsie des Herzohrs ausgewachsen sind, besiedelt. Dieser Zellmix beinhaltet Zellen welche positiv für CD105, FSP1, Vimentin, PDGF β , cTnT, α SMA und Cx43 sind. Die Zellen wurden vor der Besiedlung der Matrix mit einem Cell Tracker, welcher das Zytoskelett anfärbt, behandelt, um die Anordnung und das Wachstumsverhalten der Zellen auf den gesponnenen Matrizes zu untersuchen. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen auf den verschiedenen Scaffolds ausgesät.

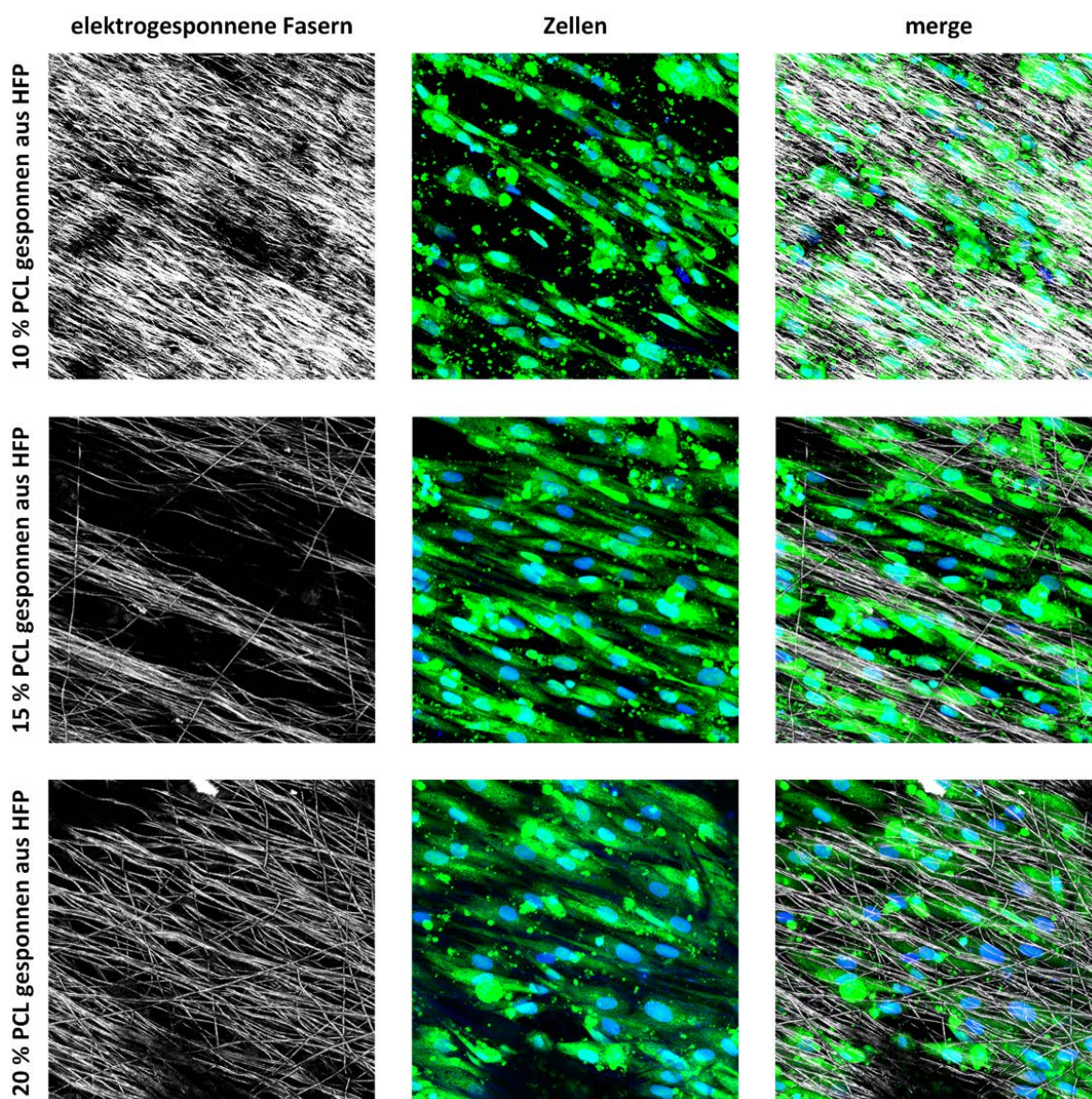


Abbildung 16: Zellen ausgesät auf PCL-Matrix, gesponnen aus HFP.

Jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen aus einer Herzohr-Biopsie wurden auf Matrizes, welche aus PCL-Lösungen verschiedener Konzentrationen mittels Elektrospinning angefertigt wurden, ausgesät. Als Lösungsmittel wurde HFP eingesetzt. Nach einer zweiwöchigen Kultur von Zellen, deren Zytoplasma grün und die Zellkerne blau angefärbt sind, auf den verschiedenen Matrizes, ist zu erkennen, dass sich die Zellen entlang der grau dargestellten Fasern anlagern beziehungsweise wachsen.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass sich die Zellen nach zweiwöchiger Kultur entlang der PCL-Fasern, welche aus HFP gesponnen wurden, anlagern und wachsen. Dabei spielt der Durchmesser der Fasern keine Rolle. Solch eine Anordnung der Zellen entspricht der Anordnung der Zellen im nativen Herzmuskelgewebe.

Das gleiche Experiment wurde auch mit Matrizes, bestehend aus PCL-Fasern, gesponnen aus Chloroform, durchgeführt. Die für den Spinningvorgang eingesetzten Polymerlösungen hatten die gleichen Konzentrationen wie der Ansatz bei dem die Fasern aus HFP gesponnen wurden.

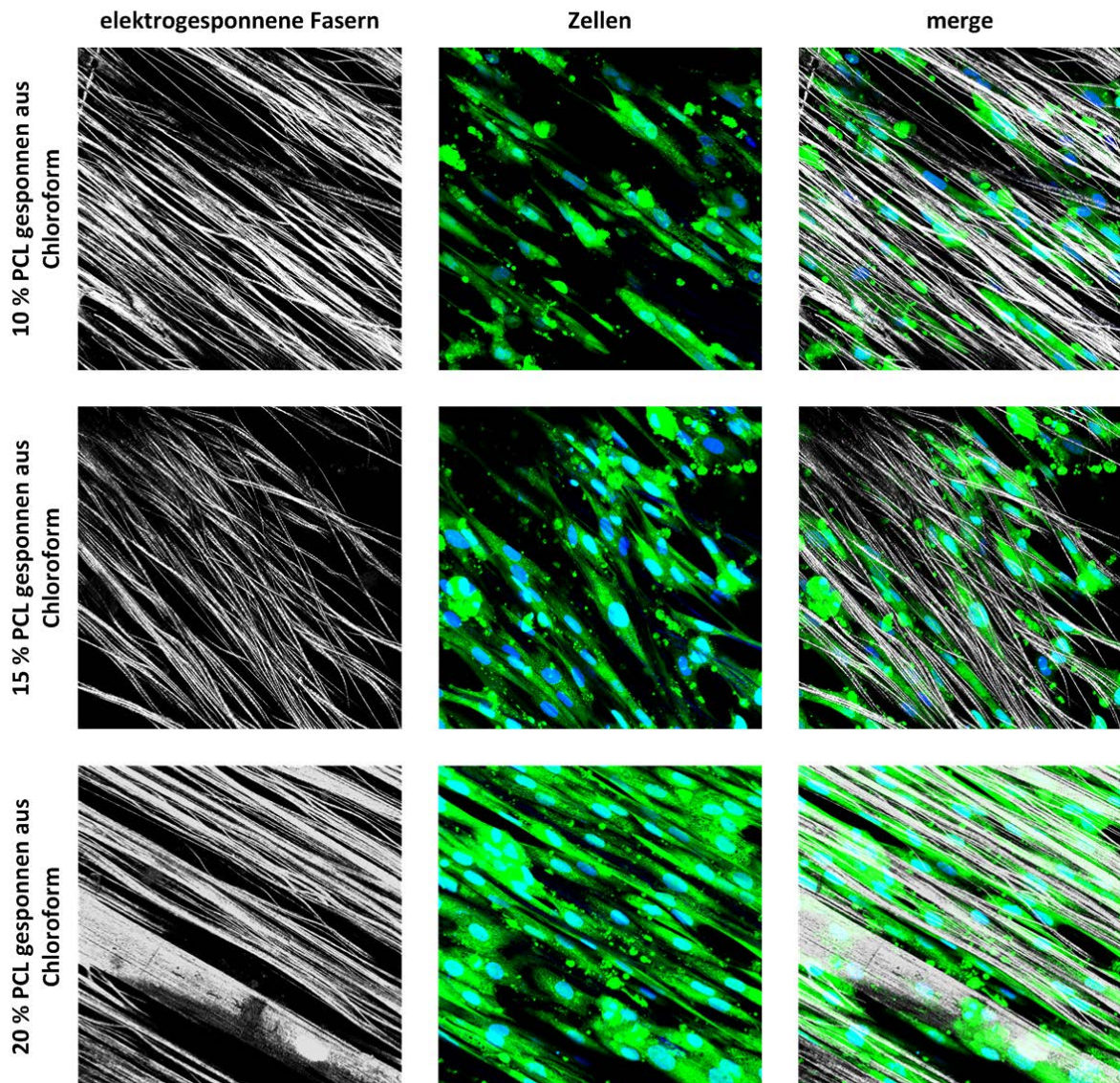


Abbildung 17: Zellen ausgesät auf PCL-Matrix, gesponnen aus Chloroform.

Auf jede Matrix wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen aus einer Herzohr-Biopsie ausgesät. Die Matrizes wurden aus Lösungen verschiedener Konzentrationen von PCL gelöst in Chloroform mittels Elektrospinning angefertigt. Nach zwei Wochen Kultur der Zellen auf den Scaffolds ist zu erkennen, dass sich die Zellen, deren Zytoplasma grün und deren Zellkerne blau gefärbt sind, bei allen Matrizes entlang der in grau dargestellten Fasern angelagert haben, beziehungsweise wachsen.

Bei dem in Abbildung 17 dargestellten Versuchsansatz ist ebenfalls zu erkennen, dass sich die Zellen ungeachtet der Polymerkonzentration der Spinning-Lösung und des daraus resultierenden Faserdurchmessers entlang der PCL-Fasern anlagern beziehungsweise wachsen.

Des Weiteren wurden die Zellen auch auf den kombinierten Scaffolds, bestehend aus PCL und Gelatine, beziehungsweise PCL mit Pulver aus dezellularisierter, porziner Herzmatrix, ausgesät.

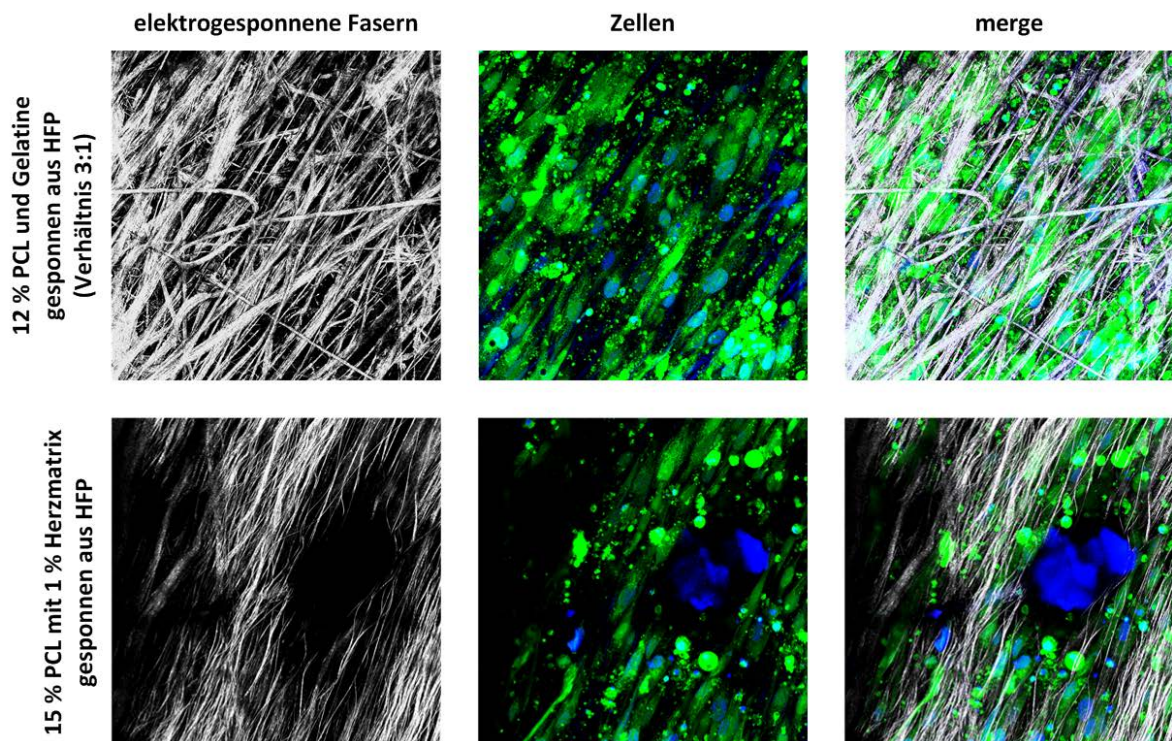


Abbildung 18: Zellen ausgesät auf kombinierten Matrizes.

Die kombinierten Matrizes wurden jeweils mit $1 \cdot 10^6$ Zellen, deren Zytoplasma grün und die Zellkern blau gefärbt sind, besiedelt. Bei der Matrix, gesponnen aus einer 12 %igen PCL/Gelatine-Lösung, mit dem Verhältnis 3:1, lagern sich die Zellen entlang der grauen Fasern an. Das gleiche Verhalten der Zellen kann bei dem Scaffold, gesponnen aus einer 15 %igen PCL-Lösung, versetzt mit 1 % pulverisierter porziner Herzmatrix beobachtet werden. In dem Bild der besiedelten Zellen und in dem merge-Bild dieser Trägerstruktur ist auf halber Höhe im rechten Drittel dieser Bilder ein blaues Aggregat zu erkennen. Dieses Aggregat ist ein Partikel der pulverisierten porzinen Herzmatrix. Durch die Eigenfluoreszenz des Kollagens in der benutzten Anregungswellenlänge für DAPI wird das Aggregat auch in blau abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sich die Zellen um den Klumpen herum, entlang der Fasern ausrichten und wachsen.

Auch in Abbildung 18 ist zu beobachten, dass sich die Zellen entlang der verschiedenen Fasern anlagern und wachsen. Bei der Matrix aus 15 % PCL mit 1 % Herzmatrix ist auf halber Höhe des rechten Drittels des Bildes der Zellen beziehungsweise bei dem merge-Bild ein großes blau erscheinendes Aggregat zu erkennen. Dieses Aggregat ist ein Pulverpartikel der pulverisierten porzinen Herzmatrix. Die blaue Erscheinung des Partikels ist auf die Autofluoreszenz des Kollagenpulvers bei dieser Anregungswellenlänge zurückzuführen. In diesem Bereich des Scaffolds lagern sich die Zellen um das Aggregat herum, entlang der Fasern an.

Eine zusammenfassende Bewertung der Konfluenz der Zellen auf den verschiedenen Scaffolds sowie deren Ausrichtung entlang der Fasern ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Konfluenz und Ausrichtung der Zellen

Scaffold	Zellen	Konfluenz der Zellen	Ausrichtung entlang der Fasern
10 % PCL, gesponnen aus HFP	Zellen aus Herzohrbiopsie	50 %	+
15 % PCL, gesponnen aus HFP	Zellen aus Herzohrbiopsie	80 %	++
20 % PCL, gesponnen aus HFP	Zellen aus Herzohrbiopsie	70 %	+
10 % PCL, gesponnen aus Chloroform	Zellen aus Herzohrbiopsie	30 %	++
15 % PCL, gesponnen aus Chloroform	Zellen aus Herzohrbiopsie	50 %	+
20 % PCL, gesponnen aus Chloroform	Zellen aus Herzohrbiopsie	90 %	+++
12 % PCL und Gelatine, gesponnen aus HFP (Verhältnis 3:1)	Zellen aus Herzohrbiopsie	60 %	+
15 % PCL mit 1% Herzmatrix, gesponnen aus HFP	Zellen aus Herzohrbiopsie	30 %	+

3.3 Inkubator

Für das Tissue Engineering werden neben geeigneten Matrices als Grundgerüst auch Zellen für den Gewebeverbund benötigt. Diese Zellen werden in einem Zellkulturlabor unter definierten Rahmenbedingungen kultiviert. Zellen benötigen neben Nährmedium weitere Umgebungsbedingungen, wie eine konstante Temperatur von 37 °C, welche die Körpertemperatur repräsentiert und eine definierte Gasatmosphäre. Des Weiteren benötigt man bei der Herstellung von Geweben mit einer Dicke von mehreren Millimetern, die Möglichkeit Zellkulturmedium in das Konstrukt zu transportieren. Kultiviert man Zellverbände von mehreren Millimetern Dicke statisch, so erfolgt der Austausch der Nährstoffe zwischen Medium und Gewebeverbund nur durch Diffusion. Die Diffusion der Nährstoffe reicht jedoch nicht in ein Gewebe von mehreren Zentimetern Dicke hinein, wodurch es zu einem nekrotischen Kern im Inneren des Gewebes kommen kann. Dieser Zustand kann dadurch umgangen werden, dass man das Zellkonstrukt perfundiert. Über eine Pumpe kann diese Perfusion des Gewebes gewährleistet werden.

Die Standard-Inkubatoren, die in der herkömmlichen Zellkultur zum Einsatz kommen, erfüllen die Anforderungen der Gasatmosphäre und der konstanten Temperatur, jedoch beinhalten sie keine Pumpeinheit, um ein Gewebekonstrukt dynamisch zu kultivieren. Es besteht die Möglichkeit bei den Standardinkubatoren eine externe Pumpe in den Kulturraum des Inkubators zu stellen, was allerdings große Einbußen der Stellfläche im Innern des Inkubators zur Folge hat. Ebenfalls ist es möglich eine Pumpe außerhalb des Brutschrankes zu installieren. Dies führt allerdings dazu, dass Schläuche zwischen 1 m und 2 m Länge benötigt werden, die den Reaktor in dem das Konstrukt kultiviert wird, mit der Pumpe verbinden. Aufgrund dieser Tatsachen ist es sinnvoll ein Inkubatorsystem mit integrierter Pumpeinheit zu entwickeln.

3.3.1 Aufbau

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Inkubatorsystem ist ein Stand-Alone-System (Abbildung 19), welches aufgrund der installierten Rollen flexibel an jeden beliebigen Ort bewegt und dort betrieben werden kann. Als externe Zuleitungen benötigt das System nur einen Strom- und einen Gasanschluss.

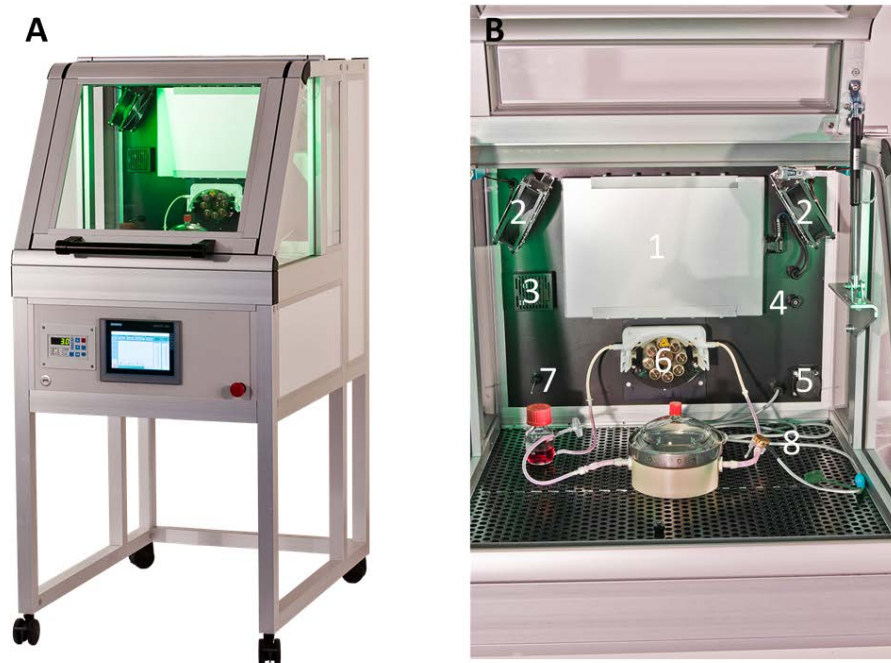


Abbildung 19: Stand-Alone-Inkubatorsystem.

(A) Das Stand-Alone-Inkubatorsystem ist aus Teilen der Firma item Industrietechnik GmbH gefertigt. Ein integrierter Touchscreen ermöglicht die Bedienung und Eingabe von Parametern. Daten können während des Betriebs über die USB-Schnittstellen aus dem Steuerungsprogramm ausgelesen werden. (B) Im Innenraum der Inkubator-Kammer sind alle notwendigen Einheiten und Sensoren installiert. Für das Erwärmen und konstant halten der Temperatur ist eine Heizplatte (1) eingebaut. Damit die Luft im Innenraum gleichmäßig verteilt wird, sind zwei Ventilatoren (2) installiert. Um den CO₂-Gehalt messen zu können, ist ein CO₂-Sensor (3) angebracht. Ebenso ist ein Zugang für CO₂ (4) installiert. Des Weiteren ist für Zerstäubungsgeräte eine Steckdose (5) eingebaut. Für den Transport des Mediums durch das Schlauchsystem ist eine Rollpumpe (6) fest im Innenraum integriert. Zur weiteren Überwachung der Prozessparameter sind in der Inkubator-Kammer ein Temperatursensor (7) und ein Drucksensor (8) zum Messen des Druckes im Kulturkreislauf eingebaut. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Geplant und konstruiert wurde der Inkubator mit der 3D-CAD Software SolidWorks der Firma Dassault Systèmes. Das Grundgerüst des Inkubators bilden Profile der Firma item Industrietechnik GmbH. Diese Profile sind durch spezielle Verbinder miteinander verschraubt. Verkleidet ist das System beim Inkubatorraum seitlich, sowie die vordere Tür mit durchsichtigen Kunststoffplatten. Die Rückseite des Inkubatorraumes sowie die Wände des dahinter befindlichen Schaltschranks sind mit undurchsichtigen Kunststoffplatten verkleidet (Abbildung 19A). Unter dem Inkubatorraum befindet sich noch ein ebenfalls mit undurchsichtigen Kunststoffplatten verkleideter separater Sektor, welcher das Touch-Bedienpult, die

Steuerung sowie eine 230 V Heizplatte mit 150 W enthält. Diese Heizplatte erwärmt den Sektor unter dem Inkubationsraum auf 37 °C. Der Wärmeübertrag in den Inkubationsraum erfolgt über die Bodenplatte aus Aluminium. Somit wird der Inkubationsraum zusätzlich vom Boden her beheizt und die Wärme erwärmt den Bioreaktor von dessen Unterseite. Eine zweite Wärmplatte ist an die Rückseite des Brutraumes geschraubt. An dieser befinden sich ebenfalls zwei in einem 30° Winkel zur Heizplatte angebrachte Ventilatoren, die einen zirkulierenden Luftstrom erzeugen und somit für das Umwälzen sowie einer gleichmäßigen Verteilung der erwärmten Luft im Inkubationsraum sorgen. Des Weiteren befinden sich an der Rückseite ein CO₂-Sensor unter einem Schutzgitter, ein Temperatursensor, Zugang-Ports für Drucksensoren und CO₂, eine Steckdose für externe Geräte und eine fest installierte Walzenpumpe. Durch die zentrale Position der Walzenpumpe sind Schläuche mit einer maximalen Länge von 30 cm für das Bioreaktorsystem ausreichend. Die Tür des Inkubators ist eine Flügeltür, welche sich nach oben hin öffnet und von einer Gasfeder gehalten wird. Sie ist mit einem Schalter verbunden, welcher bei geöffneter Türe die Gaszufuhr in das Innere des Inkubationsraumes unterbricht (Abbildung 19B). Im Schaltschrank ist die gesamte Steuereinheit des Brutschrankes untergebracht (Abbildung 20).

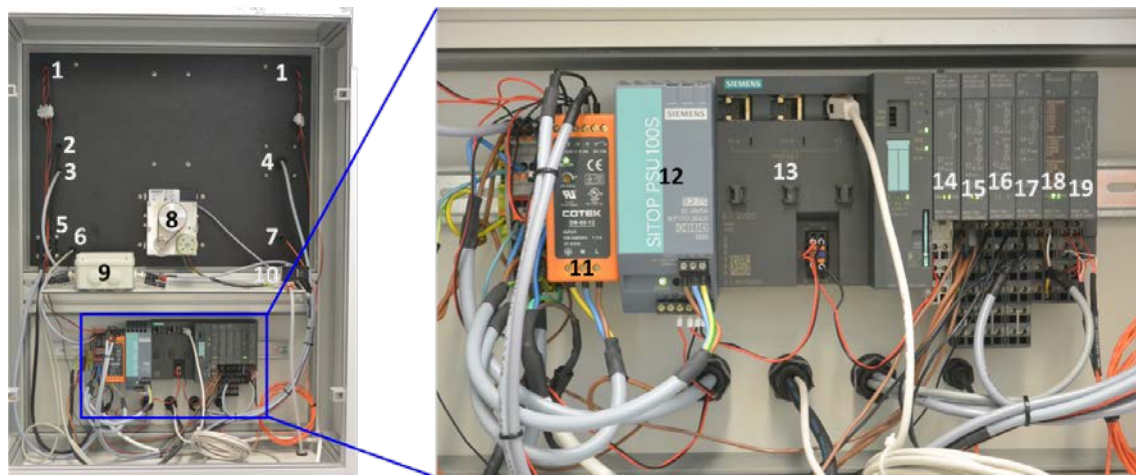


Abbildung 20: Schaltschrank Inkubator.

In dem rückwärtigen Raum des Inkubators sind die Kabel für alle Komponenten verlegt. Es sind die Kabel für die Ventilatoren (1), die Heizplatte (2), den CO₂-Sensor (4), die Steckdose (5), den Drucksensor (6), den Temperatursensor (7) und die Pumpe (8) verlegt. Des Weiteren ist die Zuleitung des CO₂ Schlauches (3) in den Innenraum des Inkubators zu sehen. Für den Betrieb des Drucksensors ist auf einer Zwischenplatte ein Messverstärker (9) installiert sowie ein Ventil (10) für den Einlass des CO₂. Die Stromversorgung der Steuerung erfolgt mit einem 12 V-Netzteil (11) sowie mit einem 24 V-Netzteil (12). Im Allgemeinen besteht die Steuerung aus der CPU (13), einem Powermodul (14), zwei Relais (15, 16), einem Analogeingangsmodul für Spannung (17), einem Kommunikationsmodul mit serieller Schnittstelle (18) und einem Analogeingabemodul für Widerstand.

3.3.2 Steuerung

Für den Betrieb des Inkubators wird die Steuereinheit ET200S von Siemens eingesetzt (Abbildung 20). Die eingesetzte Steuereinheit besteht aus einer CPU, einem Powermodul, zwei Relais, einem Kommunikationsmodul für eine serielle Schnittstelle, einem Analogeingabemodul für Spannung sowie einem Analogeingabemodul für Widerstand. Das Powermodul ist notwendig, damit die weiteren Module mit Strom versorgt werden. Die Relais sind für das Ein- und Ausschalten von verbauten Elementen zuständig. Eines der beiden Relais schaltet die Heizplatten, das andere das Ventil der CO₂-Versorgung. Damit die Pumpe angesteuert werden kann, ist das Kommunikationsmodul für die serielle Schnittstelle nötig. Für die Druckmessung im Mediumkreislauf und für die Messung des CO₂-Gehaltes im Inkubatorschrank ist das Analogeingabemodul für Spannung nötig. Mit dem Analogeingabemodul für Widerstand wird die Temperaturmessung im Inkubator realisiert.

Durch die Steuerung ist es möglich, die Temperatur im Inkubator auf konstanten 37 °C und den CO₂-Gehalt auf 5 % zu halten. Dies wird dadurch realisiert, dass die vorherrschenden Ist-Werte mit dem Soll-Wert verglichen werden. Über Regelkreise werden dementsprechend die Relais geschaltet, damit mehr CO₂ in den Inkubator geleitet wird beziehungsweise die Heizplatte ein- oder ausgeschaltet wird. Das heißt, ermittelt der CO₂-Sensor einen Wert von 4 % CO₂ im Inkubationsraum, so wird das Relais welches den CO₂-Einstrom in den Inkubator regelt, geöffnet bis sich der gewünschte Wert von 5 % CO₂ eingestellt hat. Bei Temperaturregelung werden die Heizplatten bei einer durch den Sensor ermittelten Temperatur von <37 °C so lange eingeschaltet, bis sich die Temperatur auf 37 °C erhöht hat. Des Weiteren ist es mit der Steuerung möglich die Pumpe auf vier verschiedene Arten zu betreiben. Es ist möglich die Pumpe mit einer konstanten Drehzahl, alternierend, mit einem Treppenstufenprofil und druckabhängig zu betreiben. Für den alternierenden Betrieb kann die Umdrehungszahl und ein Zeitfenster eingegeben werden, indem sich die Pumpe im Uhrzeigersinn beziehungsweise gegen den Uhrzeigersinn drehen soll. Mit dieser Betriebsmöglichkeit kann zum Beispiel das Absaugen von Medium aus einem Bioreaktor mit anschließendem Wiederbefüllen realisiert werden. Dazu kann die Pumpe so eingestellt werden, dass sie beispielweise 5 Minuten lang das Medium aus dem Bioreaktor absaugt, danach ihre Drehrichtung ändert und den Bioreaktor wieder 5 Minuten lang mit Medium befüllt. Bei einem Betrieb mit dem Treppenstufenprofil ist es möglich, diese in Bezug auf die Drehzahl oder den Druck anzuwenden. Es kann ein Anfangsdruck oder eine Anfangsdrehzahl sowie die Anzahl der Stufen und deren Dauer eingegeben werden. Die Stufenhöhe entspricht dem Wert des Anfangsdrucks beziehungsweise dem Wert der Anfangsdrehzahl, was bedeutet, dass der Wert der Stufenhöhe bei einem Anfangsdruck von 20 mmHg der Zahl 20 entspricht oder bei einer Anfangsdrehzahl von 5 U/min

der Zahl 5. Ebenfalls kann die Pumpe anhand des Druckes geregelt werden. Dazu wird der Soll-Druck des Kultursystems eingegeben. Soll die Kultur zum Beispiel unter physiologischen Druckverhältnissen von 120/80 mmHg erfolgen, so gibt man der Steuerung einen Mittelwert von 100 mmHg sowie eine Amplitude von 20 mmHg vor. Durch den Abgleich des Ist-Drucks mit dem Soll-Druck wird die Drehzahl der Pumpe erhöht beziehungsweise reduziert, bis sich der Ist-Druck dem vorgegebenen Druckprofil angeglichen hat. Bis sich ein stabiler Betrieb eingestellt hatte, musste der Prozess mehrmals validiert werden. So wurde zum Beispiel der Drucksensor fünfmal kalibriert, bis der angezeigte Druck mit dem über ein externes Messgerät gemessenen Druck übereingestimmt hat.

Alle Einstellungsmöglichkeiten sowie Regelungswege des Stand-Alone Inkubators sind im Datenflussdiagramm in Abbildung 21 dargestellt.

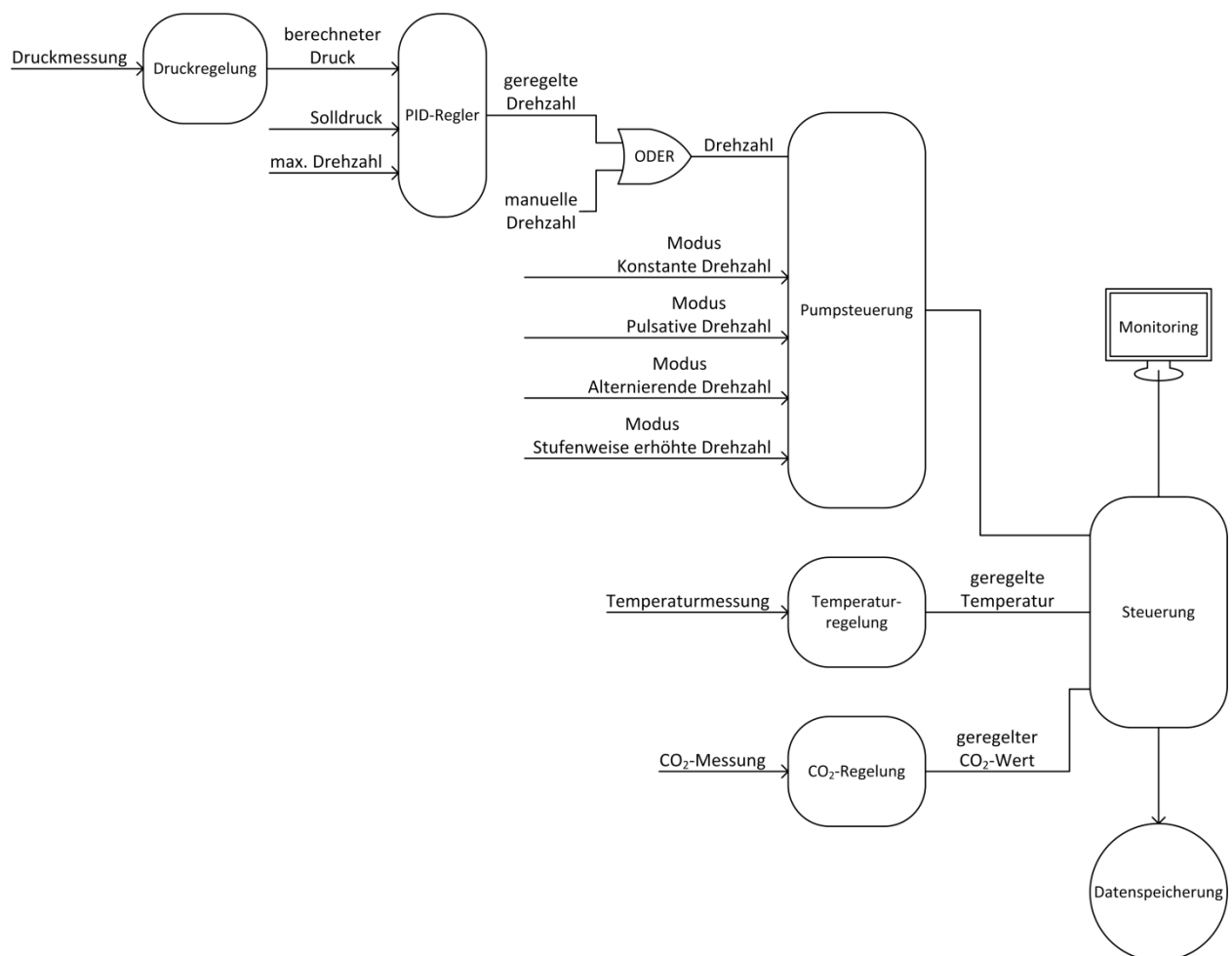


Abbildung 21: Datenflussdiagramm des Stand-Alone Inkubators

Das Diagramm zeigt die verschiedenen Einstellungsmodi des Inkubatorsystems sowie die Regelkreisläufe der Drehzahl, der Temperatur und des CO₂-Anteils.

3.4 Reaktorplattform

Ein Stand-Alone-System wie oben beschrieben, bietet einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen Standardinkubatoren. Jedoch ist es noch sehr groß und beansprucht ca. einen Quadratmeter Grundfläche des Labors in dem es aufgestellt wird. Bei diesem System geht viel Platz verloren, da unter dem Inkubatorraum und dem Geräteraum mit den Bedienpanels ein Totraum ist, der daraus resultiert, dass der Inkubationsraum auf einer anwenderfreundlichen Arbeitshöhe angelagert ist. Dieser Totraum stellt verloren Platz da und lässt Spielraum für eine Weiterentwicklung des Systems. Bei dem Stand-Alone-System wurde der konditionierte Raum so groß dimensioniert, dass große Reaktoren oder mehrere Reaktoren zur gleichen Zeit parallel betrieben werden können. Für viele Anwendungen im Tissue Engineering ist jedoch ein kleiner Inkubatorraum ausreichend. Im Bereich des vaskulären Tissue Engineerings zum Beispiel werden nur kleine Bioreaktoren benötigt, für welche ein derartig groß dimensionierter Inkubatorraum unnötig ist. Des Weiteren sind für ein solches, für Tissue Engineering geeignetes funktionelles Inkubationssystem neben der Steuereinheit nicht viele Komponenten nötig. Man benötigt eine Pumpe, um das Medium in den Bioreaktor zum Konstrukt zu befördern, einen Gasaustauscher um eine funktionierende Pufferung und Konditionierung des Mediums zu erhalten und einen Wärmetauscher, der das Medium auf die gewünschte Temperatur von 37 °C erwärmt. Diese genannten Komponenten können ebenfalls kompakt gehalten und miniaturisiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Stand-Alone-System so optimiert, dass das System komprimiert, modular mit verschiedene Komponenten aufgebaut werden kann (75). Damit ist es möglich alle Komponenten zusammen mit einem Bioreaktor in eine Box zu installieren, die von der Grundfläche ungefähr der des Stand-Alone-Systems entspricht. Diese Boxen können übereinander in einem Rack gestapelt und an eine gemeinsame Strom- und Steuerungseinheit angeschlossen werden, was zu einer effektiveren Raumnutzung führt. Im Folgenden werden die notwendigen Komponenten beschrieben.

3.4.1 Komponenten

Die Komponenten, die für ein Kultursystem notwendig sind, sind der Wärmetauscher, der Gasaustauscher und die Pumpe. Diese Einheiten wurden so konzipiert, dass sie möglichst klein gehalten und modular aufgebaut sind, das heißt, die Komponenten können in jeder beliebigen Anordnung miteinander verbunden werden. Entwickelt und konstruiert wurden alle Komponenten mit der 3D-CAD Software SolidWorks der Firma Dassault Systèmes.

3.4.1.1 Wärmetauscher

Der Wärmetauscher wurde aus zwei Aluminiumklötzen mit den Abmaßen 165 mm x 115 mm x 44 mm und zwei Heizfolien mit je 25 Watt aufgebaut. Die zwei Aluminiumplatten sind mit zwei Scharnieren und einem Verschluss so miteinander verbunden, dass der Wärmetauscher aufgeklappt werden kann (Abbildung 22).

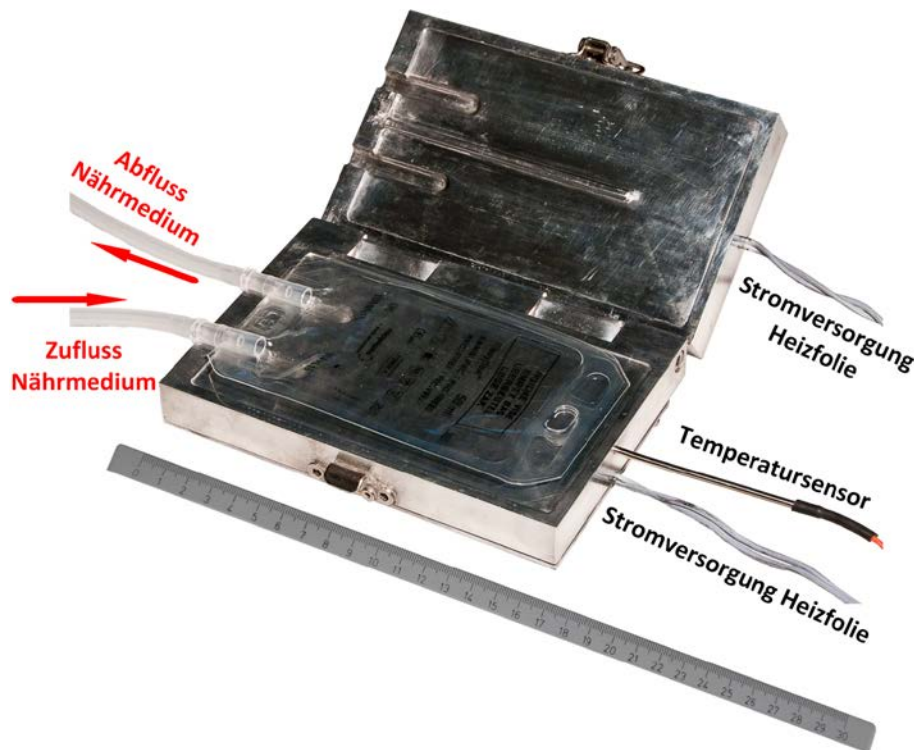


Abbildung 22: Wärmetauscher

Der Wärmetauscher besteht aus zwei verbundenen Aluminiumplatten, welche durch einen Schnappverschluss zusammengedrückt werden können. In die beiden Außenseiten der Platten ist ein Raum gefräst, in welchen jeweils eine Heizfolie eingeklebt ist. Zur Temperaturkontrolle ist ein Wärmesensor eingearbeitet. Auf den Innenseiten der beiden Platten sind jeweils Vertiefungen mit der Größe des 50 ml Infusionsbeutels sowie jeweils zwei deckungsgleiche Rinnen für den Zu- und Abfluss des Infusionsbeutels eingefräst. Eine der beiden Platten hat zwischen der Zu- und Abflussrinne einen Steg, welcher die ersten drei Viertel des Beutels trennt, um dem Medium im Beutel eine Flussrichtung vorzugeben und um die Verweildauer des Mediums im Wärmetauscher zu erhöhen. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

In den Außenseiten der zwei Platten des Wärmetauschers sind Ausfräsungen eingearbeitet, in denen jeweils eine Heizfolie mit 25 Watt eingeklebt wurde. Zur Vermeidung des direkten Kontaktes mit den Heizfolien wurden die Vertiefungen mit einem dünnen Blech aus Aluminium abgedeckt. Innen wurde

eine Kontur auf die Aluminiumplatten gefräst, welche der Größe eines Blutbeutels von 50 ml entspricht. Eine der beiden Platten hat in der Kontur einen Steg eingearbeitet, welcher dafür sorgt, dass der eingelegte Beutel in der Mitte zwischen seinen zwei Anschlüssen auf dreiviertel der Gesamtlänge in zwei Kammern geteilt wird. Dies hat den Zweck, dass das Medium, welches durch den einen Anschluss in den Beutel gepumpt wird, eine vorgegebene, gerichtete Fließrichtung hat und somit auch der Verbleib des Mediums im Wärmetauscher erhöht wird, damit das Medium auf 37 °C erwärmt werden kann. Bei dem Beutel, welcher zwischen die Platten des Wärmetauschers geklemmt wird, handelt es sich um einen handelsüblichen 50 ml Blutbeutel. Es wurden lediglich die Anschlüsse des Beutels dahingehend verändert, dass Silikonschläuche an den Beutel konnektiert werden können.

Damit das Medium nicht auf eine zu hohe Gradzahl erwärmt wird, wurde in die eine Aluminiumplatte ein Temperaturfühler eingearbeitet. Zur Ermittlung der richtigen Lage des Temperaturmessers, wurde eine Computersimulation der Erwärmung des Wärmetauschers durchgeführt.

Die Leistung der Heizfolien, die für die Erwärmung des Wärmetauschers verantwortlich sind, wurde ebenfalls mit einer Computersimulation ausgelegt (Abbildung 23).

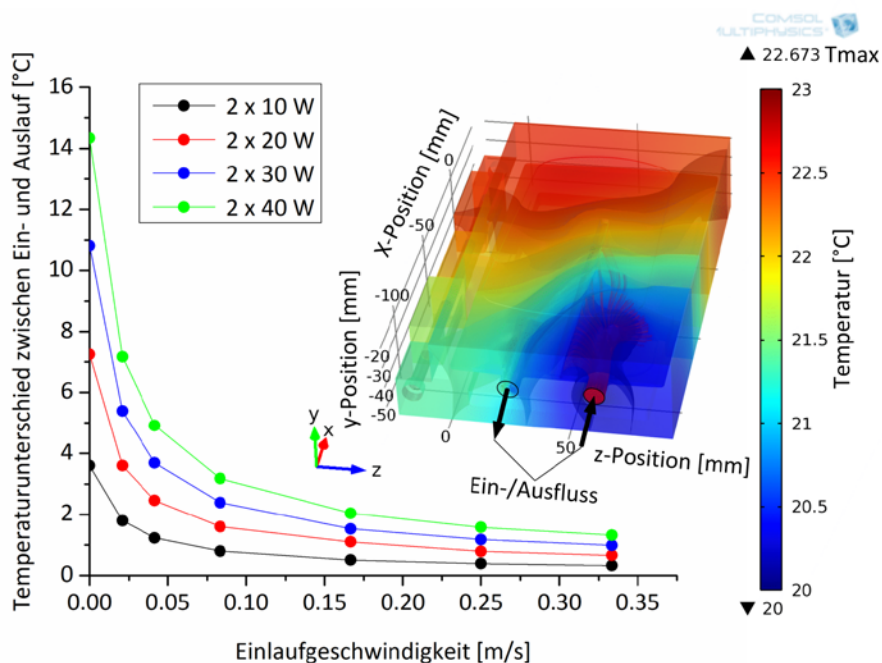


Abbildung 23: Temperaturverteilung und Mediumermwärmung in Wärmetauscher.

Eine Simulation des betriebenen Wärmetauschers, mit dem Programm COMSOL Multiphysics® Modeling Software zeigt die Temperaturverteilung von blau, der niedrigsten Temperatur bis rot, der höchsten Temperatur. Ebenso wurde die Erwärmung des Mediums bei einmaligem Durchfließen des Wärmetauschers mit verschiedenen Heizfolien (10 W, 20 W, 30 W und 40 W) bei verschiedenen Geschwindigkeiten simuliert. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Die Simulation zeigt, dass der hintere Teil des Wärmetauschers am schnellsten erwärmt wird und somit der Wärmefühler dort platziert werden muss um eine Erwärmung des Mediums über 37 °C zu verhindern, damit die darin enthaltenen Proteine nicht denaturieren. Ebenso wurde die Erwärmung des Mediums bei einmaligem Durchfluss durch den Wärmetauscher simuliert. Dabei wurde die Fließgeschwindigkeit variiert und verschiedene Heizfolien mit unterschiedlicher Leistung in Betracht gezogen. Die Charakteristik der Kurven für die verschiedenen Heizfolien ist ähnlich. Aufgrund dieser Daten wurden zwei Heizfolien mit je 25 W für den Betrieb des Wärmetauschers ausgewählt. Dieses Setup wurde bezüglich der Erwärmung des Mediums im System über die Zeit getestet. Dazu wurde ein System, welches 200 ml Medium enthielt, aufgebaut.

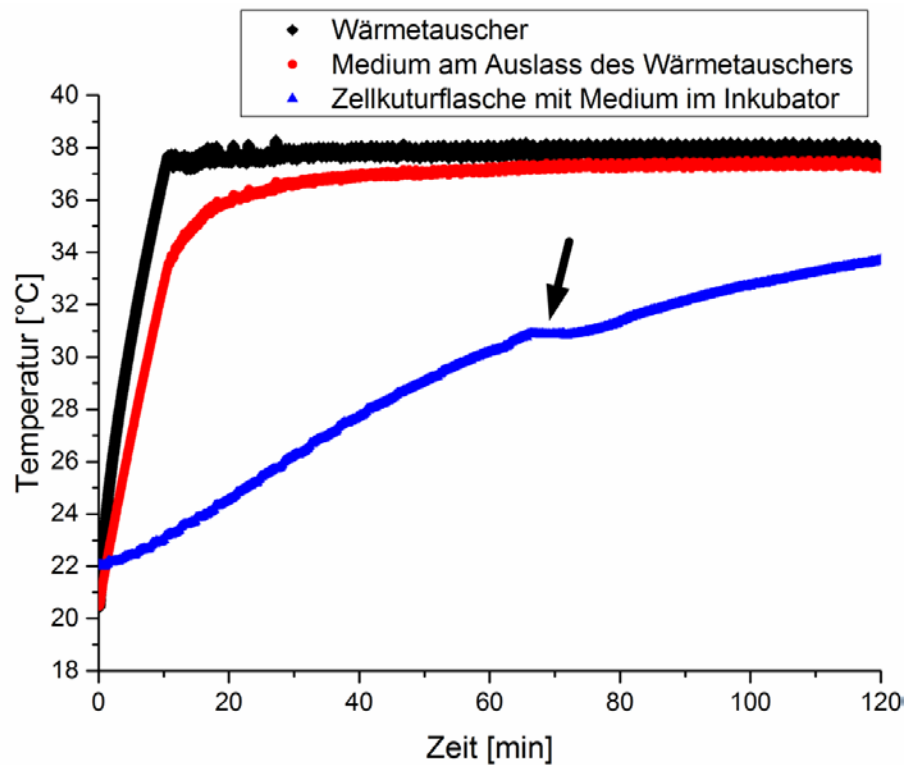


Abbildung 24: Erwärmungscharakteristik

Der schwarze Graph zeigt die Erwärmung des Wärmetauschers unter Einsatz von zwei 25 W Heizfolien auf 37 °C innerhalb von zehn Minuten, der rote Graph die Erwärmung der 200 ml Medium des Kulturkreislaufsystems auf 37 °C in 30 Minuten. Über die Kulturdauer kann die Temperatur durch den Wärmetauscher konstant gehalten werden. Der blaue Graph zeigt die Erwärmung von 200 ml Medium in einer Zellkulturflasche in einen Standardinkubator über den Zeitraum von 120 Minuten. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Das Diagramm in Abbildung 24 zeigt die Erwärmung des Wärmetauschers und des Mediums im Kulturkreislauf über die Zeit unter dem Einsatz der zwei 25 W Heizfolien. Anhand des Diagramms ist zu erkennen, dass der hintere Teil des Wärmetauschers in dem sich der Temperatursensor befindet nach ca. zehn Minuten die Temperatur von 37 °C erreicht hat und diese danach konstant gehalten wird. Die 200 ml Medium im Kulturkreislauf sind hingegen nach ca. 30 Minuten auf knapp 37 °C erwärmt. Diese Temperatur kann ebenfalls über die Zeit konstant gehalten werden. Zur Validierung der Erwärmung des Mediums durch den Wärmetauscher dienen 200 ml Medium in einer Zellkulturflasche, welche in einem Standardinkubator steht, als Referenz. Die Erwärmung des Mediums auf 37 °C im Standardinkubator benötigt eine längere Zeitspanne und ist nach 120 Minuten noch nicht abgeschlossen. Der mit einem

Pfeil markierte Knick in der Erwärmungskurve des Mediums im Standardinkubator stellt das einmalige Öffnen der Tür des Inkubators dar.

3.4.1.2 Gasaustauscher

Die zweite Komponente des Kultursystems ist ein Gasaustauscher, dargestellt in Abbildung 25. Mit Hilfe eines Gasaustauschers kann das Medium konditioniert und das Puffersystem aufrechterhalten werden. Es ist üblich für den Gasaustausch bei Bioreaktorsystemen einen Luftfilter zu verwenden, welcher auf die Mediumreservoirflasche aufgesteckt wird. Wird der Filter mit Medium benetzt, entsteht an dieser Stelle ein Portal, welches eine Kontamination der Kultur ermöglicht. Daher wurde ein abgeschlossener Gasaustauscher entwickelt.



Abbildung 25: Gasaustauscher

Der Gasaustauscher ist ein rundes Bauteil, bestehend aus zwei Seitenstücken einem gasdurchlässigen Silikonschlauch und einem äußeren Schlauch. An den Seiten der Randelemente befindet sich jeweils ein Luer-Lock-Anschluss für den Mediumkreislauf und an den Stirnseiten jeweils ein Anschluss für den Gaskreislauf. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Der Gasaustauscher besteht aus insgesamt vier Komponenten: zwei runden Randteilen, einem gasdurchlässigen Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 20 mm, einer Länge von 160 mm und einem flüssigkeits- und gasundurchlässigen Schlauch mit einem Innendurchmesser von 28 mm und einer Länge von 150 mm. Die Randstücke haben mittig eine Halterung für den Schlauch mit dem Innendurchmesser von 20 mm und eine äußere Halterung für den Schlauch mit 28 mm Innendurchmesser. Befestigt werden die Schläuche indem sie über die Halterungen gestülpt werden. An den Randteilen befindet sich ebenfalls ein Port für den Anschluss eines Gasschlauches in der Mitte der Außenseite und ein Anschluss für die Mediumschläuche auf der Mantelfläche. Aufgrund dieser

Anordnung der Anschlüsse wird das Gas durch den dünneren, in der Mitte befindlichen Schlauch geleitet und das Medium durch den sich bildenden Raum zwischen den beiden Schläuchen. Da der dünnere, mittlere Silikonschlauch durchlässig für Gase ist, kann das Gas durch die Schlauchwand in das Medium diffundieren (Abbildung 26).

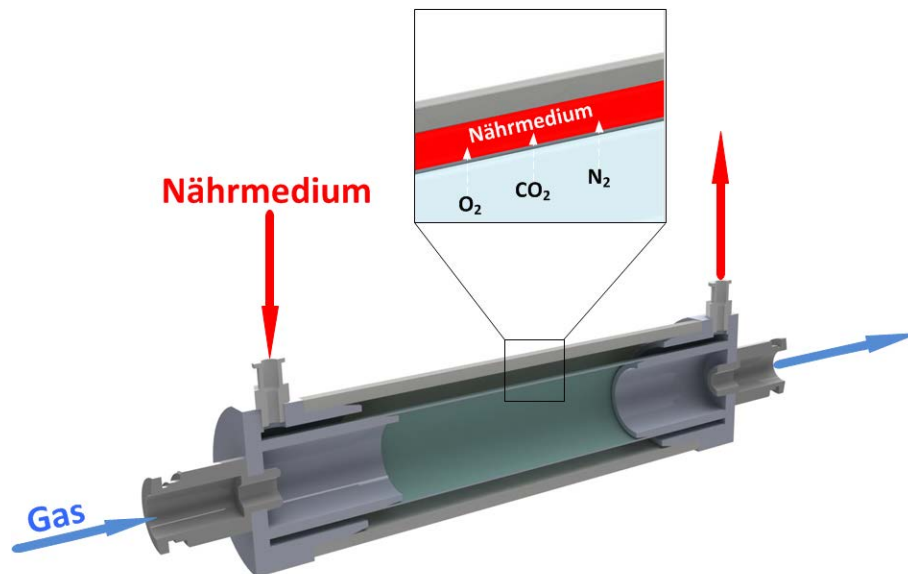
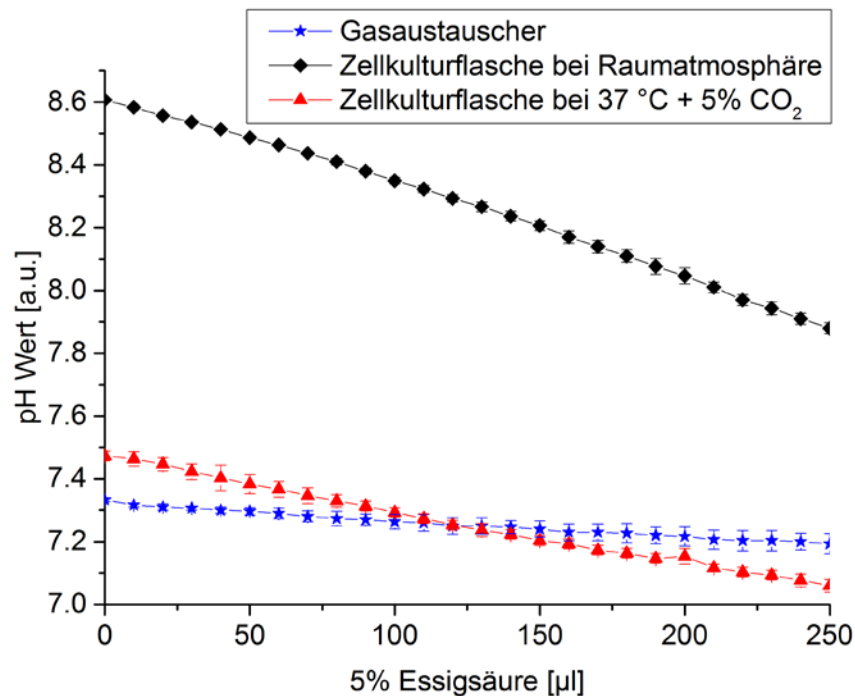


Abbildung 26: Schnittdarstellung Gasaustauscher

Die beiden Schläuche verbinden die Seitenteile miteinander. Der innere gasdurchlässige Schlauch bildet das Kompartiment durch welches das Gasgemisch geleitet wird. Zusammen mit dem äußeren Schlauch erzeugt der innere Schlauch einen Zwischenraum, durch den das Medium gespült wird. Über den gasdurchlässigen inneren Schlauch kann ein Gasaustausch mit dem Medium erfolgen. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Gasaustauschers wurde Medium auf drei verschiedene Arten für 4 Stunden vorkultiviert, anschließend mit 5 %iger Essigsäure versetzt und dann miteinander verglichen (Abbildung 27). Die drei Kultivierungsarten erfolgten in einer Gasflasche mit Standardluftfilter bei Raumatmosphäre, in einer Glasflasche mit Standardluftfilter unter Standardzellkulturbedingungen und im Gasaustauscher bei 37 °C unter 5 % CO₂ Begasung. Im Anschluss an die Kultivierung wurde in jedes Medium insgesamt 250 µl 5 %iger Essigsäure in jeweils 10 µl Schritten im Abstand von 2 Minuten zugegeben und der pH-Wert nach jeder Zugabe der Säure gemessen. Das unter Raumatmosphäre kultivierte Medium, hatte zu Beginn der Messung einen pH-Wert von 8,6. Mit jeder Zugabe von Essigsäure sank der pH-Wert ab, bis sich nach der Zugabe der 250 µl Essigsäure ein pH-Wert von 7,9 einstellte. Somit fiel der pH-Wert um 0,7 ab. Bei dem Medium welches unter

Standardzellkulturbedingungen inkubiert wurde, konnte ebenfalls ein Abfall des pH-Wertes beobachtet werden. Der pH-Wert zu Anfang der Messung hatte bei diesem Medium ein Wert von 7,5 und am Ende der Essigsäurezugabe einen reduzierten Wert von 7,05. Der Abfall des pH-Wertes betrug 0,45. Für das Medium welches bei 37 °C im Gasaustauscher kultiviert wurde, ergab sich ein Startwert für den pH-Wert von ca. 7,3. Dieser pH-Wert hielt sich über die gesamte Zugabe der Essigsäure annähernd konstant. Es ist lediglich ein leichter Abfall des pH-Wertes von ca. 0,05 zu erkennen.



11

Abbildung 27: Pufferungspotential des Gasaustauschers

Die Testung des Leistungspotentials des Gasaustauschers erfolgte mittels drei unterschiedlicher Bedingungen. Der schwarze Graph zeigt die Abnahme des pH-Wertes des Mediums in einer Glasflasche mit Standardluftfilter bei Raumtemperatur und Raumtemperatur und Raumtemperatur, der rote Graph die Abnahme des pH-Wertes des Mediums in einer Glasflasche mit Standardluftfilter bei 37 °C und unter 5 % CO₂ und der blaue Graph die Abnahme des pH-Wertes des Mediums im Gasaustauscher welcher bei 37 °C mit 5 % CO₂ begast wurde. Nach der vierstündigen Inkubationszeit unter den entsprechenden Bedingungen wurden in 80 ml des Mediums 25-mal im Abstand von 2 Minuten jeweils 10 µl 5 %ige Essigsäure zugegeben. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

3.4.1.3 Beutelpumpe

Ein wesentlicher Bauteil für einen Kulturkreislauf ist eine Pumpe. Damit die Pumpe möglichst klein und kompakt gehalten werden kann, wurde das Model einer Beutelpumpe gewählt. Dieser Aufbau der

Pumpe hat den Vorteil, dass ein physiologischer, pulsatiler Fluss erzeugt werden kann. Die Pumpe besteht aus einem Gehäuse, welches aus zwei Polyvinylidenfluoridplatten besteht, die über ein Scharnier verbunden sind und im geschlossenen Zustand mittels Schrauben fest miteinander verschraubt werden können. Das so entstandene Gehäuse hat eine Dimension von 165 x 113 x 20 mm. In die Innenseite der Platten wurde eine Kontur in der Größe eines gefüllten 50 ml Blutbeutel geätzt. Des Weiteren sind an den zwei Stirnseiten der Platten Ausgänge für die zwei Anschlüsse der Blutbeutel ausgespart (Abbildung 28).

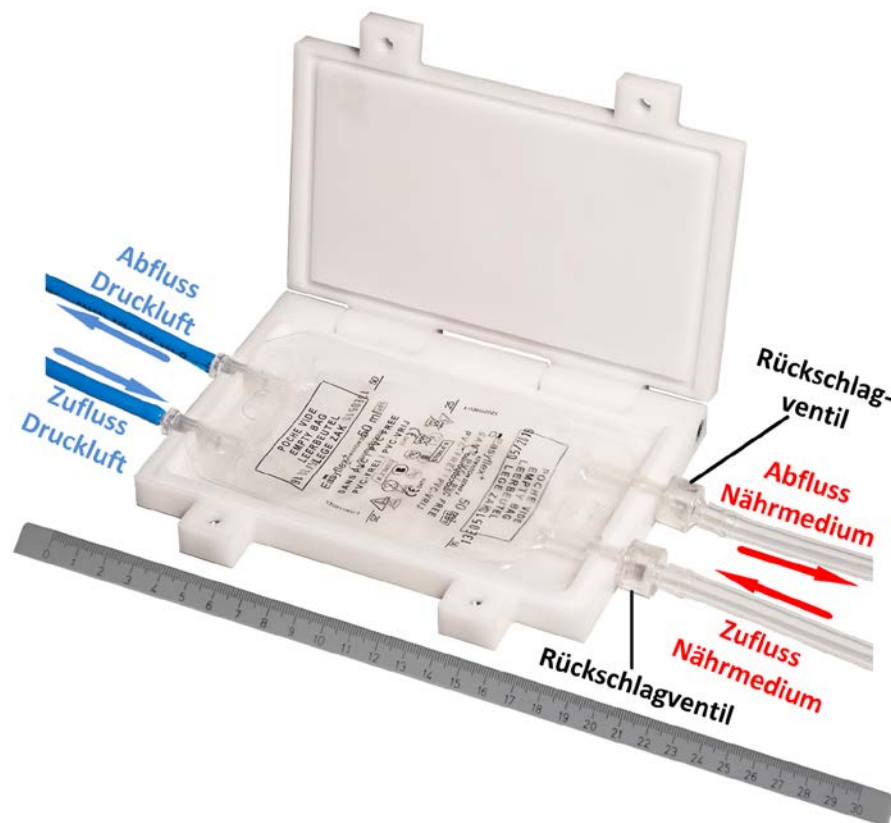


Abbildung 28: Beutelpumpe

Das Gehäuse der Pumpe besteht aus zwei Polyvinylidenfluoridplatten, welche mittels zwei Scharnieren miteinander verbunden sind. In die eine Platte ist eine Vertiefung mit je zwei Ausgängen an beiden Enden für die Anschlüsse der Beutel eingefräst. Die Vertiefung hat die Größe eines 50 ml Infusionsbeutel und ist so tief, dass ein mit 50 ml gefüllter Beutel darin Platz findet. Mit Hilfe von zwei Schrauben kann das Pumpengehäuse fest verschlossen werden. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Die zwei verwendeten Kunststoffbeutel sind handelsübliche 50 ml Beutel, welche auch bei dem Wärmetauscher zum Einsatz kommen. Der eine Beutel dient als Mediumbeutel, der andere wird mit Luft

befüllt, um das Medium aus dem Mediumbeutel auszudrücken. Damit die Beutel die jeweiligen Aufgaben erfüllen können, sind diese verändert worden, so dass der Beutel in den die Luft gepumpt wird, mit zwei Konnektoren an das pneumatische System angeschlossen werden kann. Der Mediumbeutel erhielt zwei Rückschlagventile, wobei das eine Ventil eine Befüllung und das anderen das Entleeren des Beutels zulässt. Die zwei modifizierten Beutel werden übereinander in das Pumpgehäuse gelegt und das Gehäuse verschraubt. Für einen kontinuierlichen Mediumfluss im Kultursystem sind zwei dieser Pumpen notwendig (Abbildung 29).

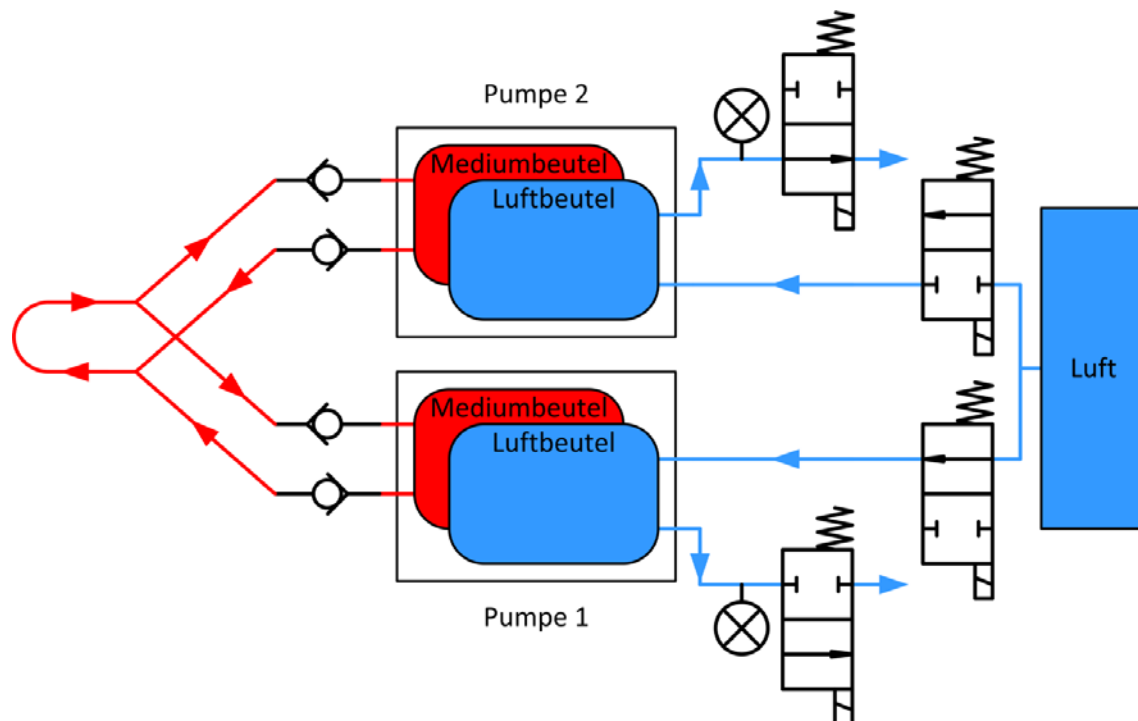


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Prinzips der Beutelpumpe

Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau und die Verschaltung der Beutelpumpen mit allen nötigen Komponenten um einen kontinuierlichen Fluss im System zu erhalten.

Die Förderung des Mediums erfolgt dadurch, dass der leere Luftbeutel über eine Steuerung mit Luft aufgeblasen wird bis ein definierter Druck erreicht ist. Durch die Vergrößerung des Volumens dieses Beutels wird das Medium aus dem gefüllten Mediumbeutel herausgedrückt (Abbildung 30). Dem Medium ist durch den Einsatz von Rückschlagventilen nur eine mögliche Fließrichtung vorgegeben.

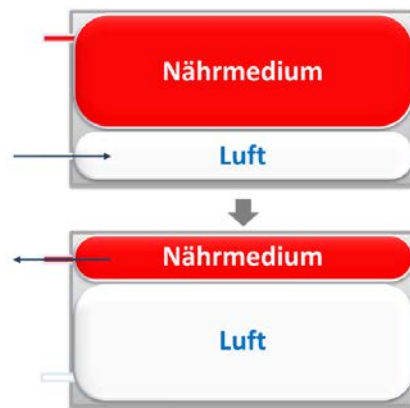


Abbildung 30: Funktionsschema der Beutelpumpe.

Die Darstellung zeigt die Funktion der Beutelpumpe und im speziellen die Funktion und Aufgabe der zwei 50 ml Infusionsbeutel im Pumpengehäuse. Der Mediumbeutel ist zunächst gefüllt und der Luftbeutel ist leer. Wird der Luftbeutel befüllt, nimmt dieser mehr Volumen im Pumpengehäuse ein und drückt dadurch das Medium aus dem Mediumbeutel raus.

Dies geschieht bei zwei miteinander verbundenen Pumpen, bei welchen abwechselnd der Beutel mit Luft gefüllt wird. Durch diesen Prozess kommt eine bestimmte Druckcharakteristik (Abbildung 31) zustande, je nachdem wie der Minimal-, beziehungsweise der Maximaldruck für das Luftsystem gewählt wird.

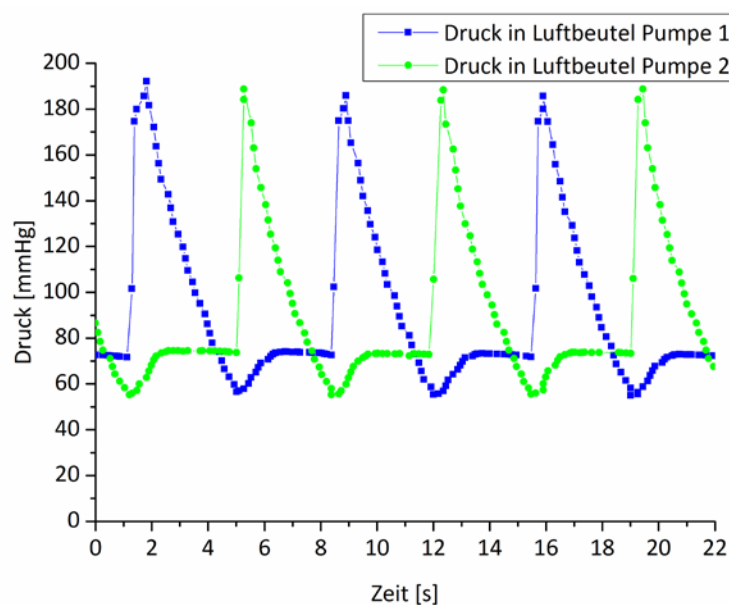


Abbildung 31: Druckcharakteristik des Luftsystems.

Das Diagramm zeigt eine typische Druckcharakteristik des Luftsystems zweier zusammenschalteter Pumpen, für welche ein Druckmaximum von 195 mmHg und ein Druckminimum von 55 mmHg festgelegt ist. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Für den Versuch, zu dem das Diagramm gehört, wurde für das Luftsystem auf einen Maximaldruck von 195 mmHg und einen Minimaldruck von 55 mmHg eingestellt. Die Druckspitzen und –minima treten immer abwechselnd und mit gleichen Abständen auf. Aufgrund des Feedbacks des Mediumkreislaufes kommt nach dem Druckminimum des jeweiligen Beutels des Luftsystems eine geringe Erhöhung des Druckes in dem Luftbeutel zustande.

Je nach Vorgabe der Drücke im Luftsystem kann im Mediumkreislauf ein gewünschtes Druckprofil herbeigeführt werden. Dieses kann von Probe zu Probe variieren, da biologische Gewebe in ihren Eigenschaften nicht identisch sind.

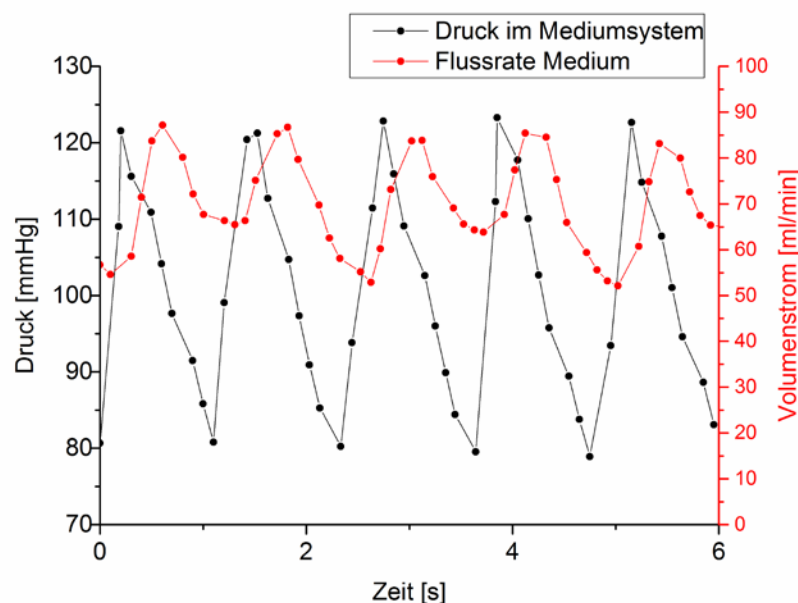


Abbildung 32: Druckprofil des Mediumsystems und daraus resultierende Flussrate

Die schwarze Kurve zeigt das im Mediumsystem eingestellte physiologische Druckprofil von 120/80 mmHg welches in einen Volumenstrom, dargestellt durch die rote Kurve, resultiert und eine Schwankungen zwischen 50 ml/min und 85 ml/min aufweist. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Mit Hilfe des eingestellten Druckprofils im Luftsystem kann im Kulturkreislauf ein physiologischer Blutdruck von 120/80 mmHg simuliert werden (Abbildung 32). Daraus kommen in Abhängigkeit der biologischen Probe individuelle Volumenströme zustande.

3.4.2 Aufbau

Alle oben beschriebenen Komponenten sind die Hauptbestandteile des entwickelten Kultursystems. Im Allgemeinen besteht das Kultursystem aus einem Mediumkreislauf (Abbildung 33) und der Peripherie. Zusammengesetzt wird der Medienkreislauf aus den 50 ml Infusionsbeuteln, welche in den Wärmetauscher (3) und die Beutelpumpe (1) eingelegt werden. Rückschlagventile (2) an den Ein- und Ausgängen der Beutel der Pumpe gewährleisten, dass das Kulturmedium nur in eine Richtung gepumpt werden kann. Nach der Pumpe und dem Wärmetauscher ist der Gasaustauscher (4) in den Kreislauf integriert. Zur Befüllung des Systems ist ein sich selbst verschließender Port (6) eingebaut. Dem Port ist eine Blasenfalle (7) nachgeschaltet, damit der Kreislauf blasenfrei befüllt, beziehungsweise die im System bereits enthaltene Luft oder sich während des Kulturzeitraums sich bildende Blasen aus dem System entfernt werden kann. Im Anschluss an die Blasenfalle ist die Gewebekammer (10) platziert. Dieser können Sensoren zur Überwachung des Drucks (8) und der Flussgeschwindigkeit (9) vorgeschaltet werden. Ein Bypass (11) ermöglicht eine Kompartimentierung des Bioreaktors. Alle Bestandteile werden durch Silikonschläuche und über Luer-Lock-Anschlüsse miteinander verbunden. Der Gasaustauscher hat bei dieser Aufteilung in Medienkreislauf und Peripherie eine besondere Stellung, da er durch seine zwei Kompartimente, zu beiden Gruppen gehört. Die Peripherie setzt sich aus dem Wärmetauscher, den Pumpgehäusen mit den an den Luftkreislauf angeschlossenen Beuteln, der Gasversorgung und der Steuerung mit den Sensoren zusammen.

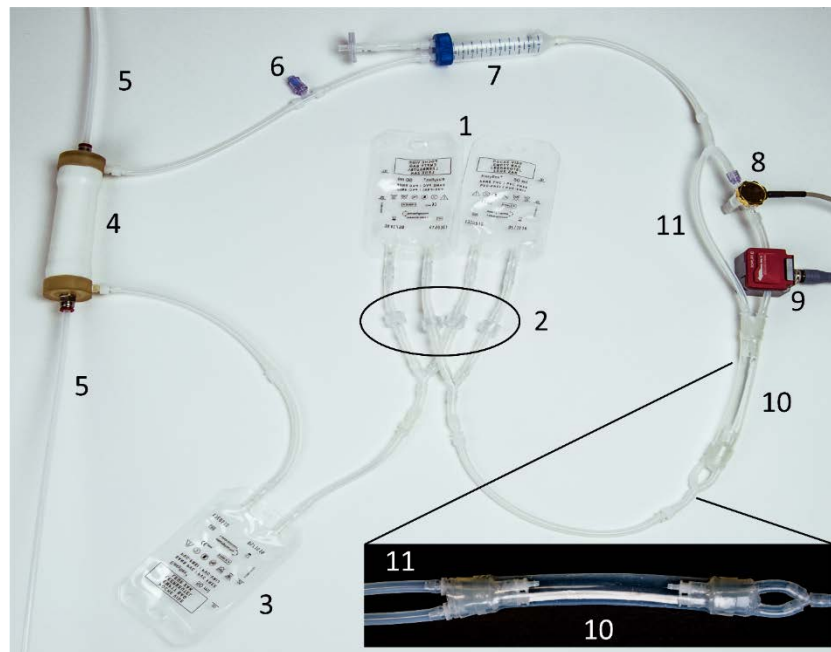


Abbildung 33: Mediumkreislauf des Kultursystems

Alle Einzelkomponenten des Mediumkreislaufs werden mittels Silikonschläuchen und Luer-Lock-Anschlüssen miteinander verbunden. Für einen kontinuierlichen Fluss werden zwei Beutelpumpen benötigt. Die Ein- und Ausgänge der Beutel (1) der beiden Beutelpumpen werden über Y-Stücke miteinander verbunden. Rückschlagventile (2) sind so an den Ein- und Ausgängen der Beutel angebracht, dass nur eine Flussrichtung des Mediums möglich ist. Den Beuteln der Pumpe ist der Beutel für den Wärmetauscher (3) nachgeschaltet. Als nächstes ist der Gasaustauscher (4) mit den Zuleitungen für das Gasmisch (5) in den Kreislauf integriert. Ebenso sind ein Port (6) für das Befüllen des Kreislaufs mit Medium, eine Blasenfalle (7), ein Drucksensor (8) und ein Flusssensor (9) in das System integriert. Das nächste Element ist das Gewebe im Bioreaktor (10) welche zu einem geschlossenen Kreislauf mit den Beuteln der Pumpe verbunden ist. Ein Bypass (11) ermöglicht das Umspülen des Konstrukts im Bioreaktor mit Medium. Die Abbildung ist modifiziert von Schuerlein et al. 2016, mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Führt man die Peripherie und den Mediumkreislauf zusammen, so entsteht ein Kultursystem (Abbildung 34) mit dem unter verschiedenen kontinuierlichen Bedingungen Gewebe beziehungsweise Gewebekonstrukte kultiviert werden können. Der Mediumkreislauf sowie das Luftsystem werden durch integrierte Sensoren überwacht und geregelt. Die Luftzufuhr für die Beutelpumpe wird über Ventile derart gesteuert, dass die zwei verschiedenen Beutel immer abwechselnd befüllen werden.

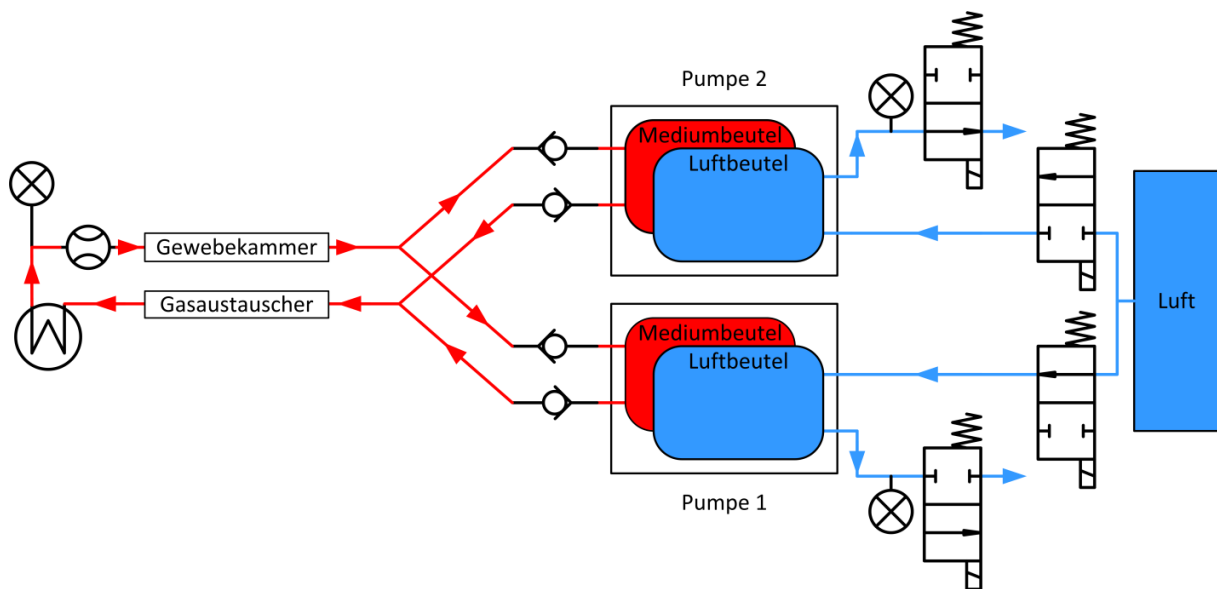


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Kultursystems im Kreislauf

Das Schema zeigt alle Komponenten, die in dem System zur Kultivierung der Konstrukte zur Anwendung kommen. Der Aufbau und Anschluss der Beutelpumpe an das Kultur- und Luftsystem ist veranschaulicht.

3.4.3 Steuerung

Zur kontinuierlichen Aufrechterhaltung des Kreislaufs mit den gewünschten Parametern wird die Steuerung ET200S von Siemens eingesetzt. Aufgebaut ist die Steuereinheit aus einer CPU, einem Powermodul, vier Relais, einem Analogeingabemodul für Strom, einem Analogeingabemodul für Spannung und einem Analogeingabemodul für Widerstand. Die Relais schalten die Heizfolien im Wärmetauscher, die vier Ventile des Luftkreislaufes zur Befüllung der Beutel in der Beutelpumpe und das Ventil für den CO₂-Einlass in den Gasaustauscher. Für die Messung der Prozessparameter im System sind die Analogeingabemodule zuständig. Das Analogeingabemodul für Strom ist für die Druckmessung in den Luftbeuteln der Beutelpumpe notwendig, das Analogeingabemodul für Spannung für die Druckmessung im Mediumkreislauf und für die Messung des CO₂-Gehaltes im Gasaustauscher und das Analogeingabemodul für Widerstand für die Temperaturmessung im Wärmetauscher. Die Regelung der Temperatur und des Einlasses erfolgt über Regelkreise, wobei die Ist-Werte mit den Soll-Werten verglichen werden und demnach die entsprechenden Relais geschaltet werden. Ist zum Beispiel ein CO₂-Gehalt von 5 % im Gasaustauscher erreicht, so wird das Ventil der CO₂-Versorgung durch das Umschalten des Relais geschlossen. Über das Bedienpanel kann der Höchst- sowie der Minimaldruck in den Beuteln des Luftsystems, ein Zeitintervall, wie lange die Ventile für diesen Luftfluss geöffnet sein

sollen und die Soll-Temperatur eingegeben werden. Der CO₂-Gehalt von 5 % ist in der Steuerung als Standard hinterlegt.

Alle Einstellungsmöglichkeiten sowie Regelungswege des Stand-Alone Inkubators sind im Datenflussdiagramm in Abbildung 35 dargestellt.

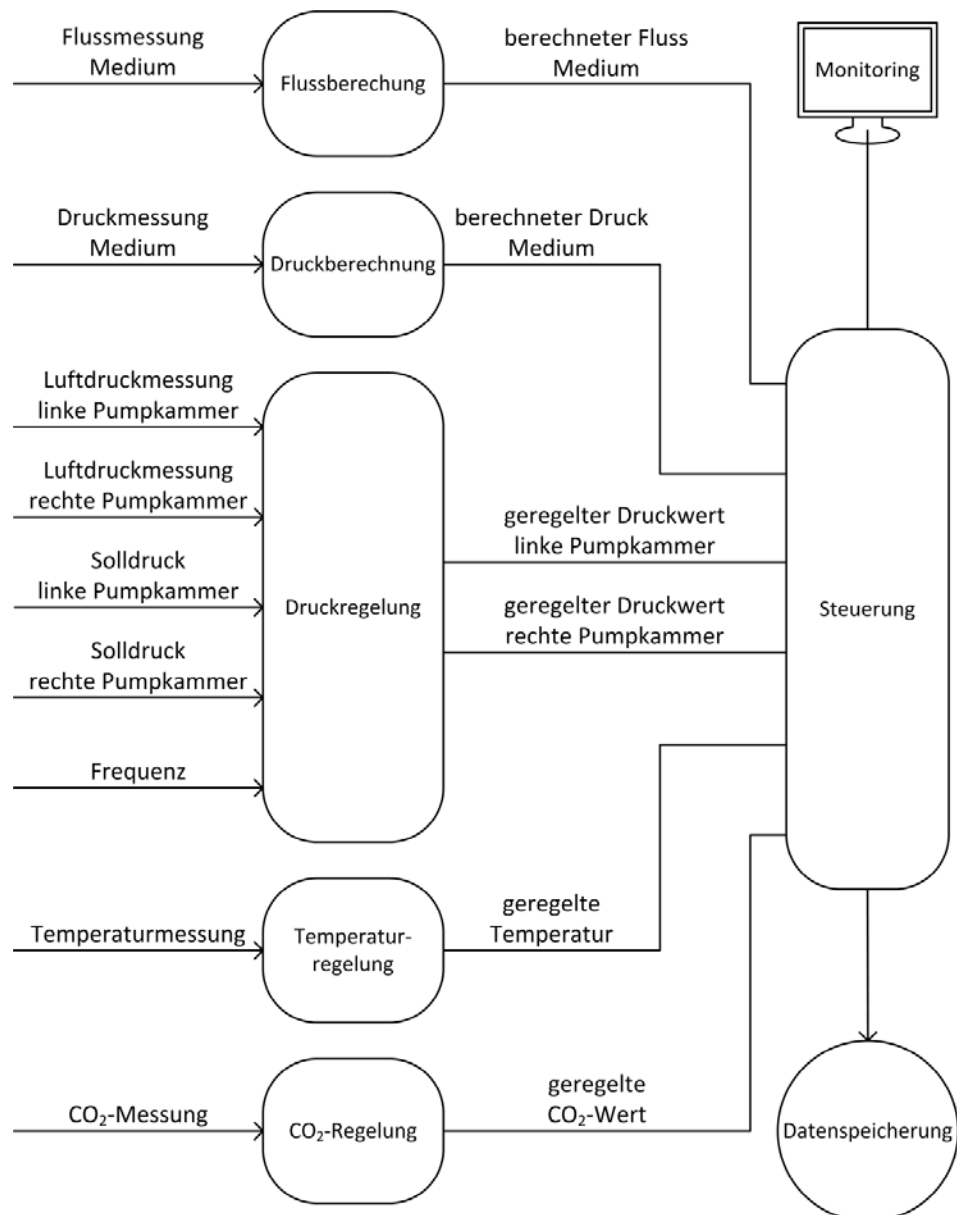


Abbildung 35: Datenflussdiagramm der Steuerung der Bioreaktorplattform

Das Datenflussdiagramm zeigt alle Kulturparameter auf, welche nur gemessen sowie diejenigen, die ebenfalls geregelt werden. Bis auf den Druck im Medium und den Fluss des Mediums, welche nur angezeigt werden, werden alle anderen Parameter durch die Steuerung geregelt.

3.4.4 Gewebekultur

Für eine Testung der Funktionsfähigkeit des Kultursystems mit allen Komponenten sowie der Steuerung wurde eine Gewebekultur durchgeführt. Als biologisches Referenzmaterial diente eine Halsschlagader (Karotis) von einem jungen Hausschwein, welche in einen Bioreaktor fixiert und für 7 Tage in diesem Kultursystem mit dem Medium VascuLife® der Firma Life Technologies kultiviert wurde. Nach dem Kulturzeitraum erfolgte die Fixierung des Blutgefäßes mit 4 %igem PFA und der Einbettung in Paraffin. Die Durchführung einer H&E-Färbung sowie einer Immunfluoreszenzfärbung gegen alpha smooth muscle actin (α SMA) und gegen den spezifischen Endothelzellmarker CD31 (Abbildung 36) anhand von Paraffinschnitten diente zur Beurteilung der Morphologie und der Expression der spezifischen Marker des nativen Gewebes. Verglichen wurde das im entwickelten Kultursystem kultiviert Gewebe mit einer, für die gleiche Dauer statisch kultivierten Karotis.

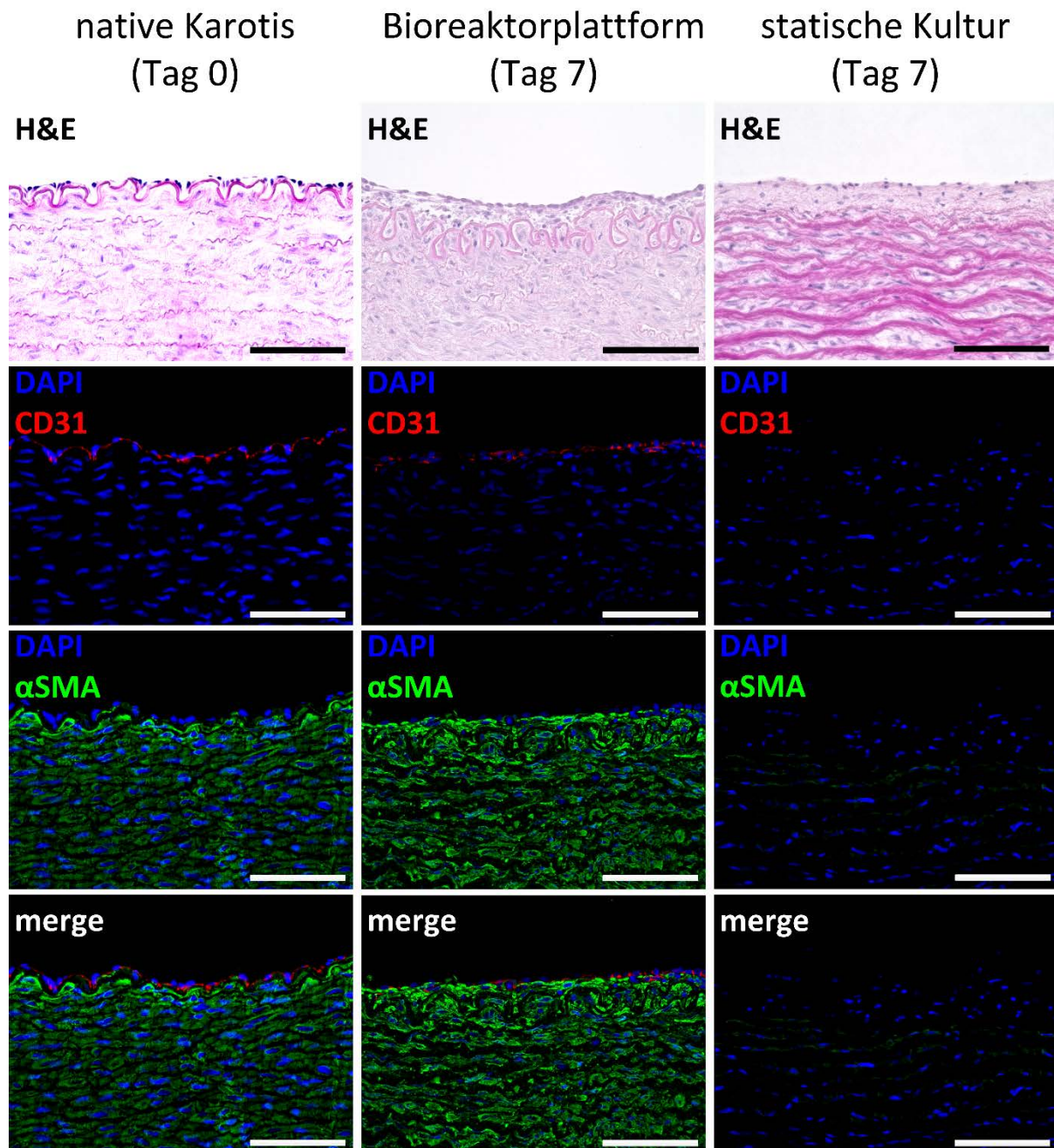


Abbildung 36: Histologie porciner Karotiden

Histologischer Vergleich der Karotis aus der Bioreaktorplattform mit einer nativen Karotis und einer statisch kultivierten Karotis. Die Hämatoxylin und Eosin-Färbungen zeigen, dass das Gewebe aus der Bioreaktorkultur morphologisch dem der nativen Karotis entspricht. Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD31 und alpha smooth muscle actin (α SMA) zeigen, dass die Bioreaktorkultur sowie die native Karotis einen geschlossenen Monolayer von Zellen, welche für CD31 positiv sind, besitzen. Ebenso ist eine vergleichbar hohe Expression von α SMA bei der Bioreaktorkultur und der nativen Karotis in den tieferen Gewebeschichten zu beobachten. Keine dieser Beobachtungen ist bei der statischen Kultur zu erkennen. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μ m.

In den H&E-Färbungen ist deutlich die dicke Schicht der glatten Muskulatur bei allen drei Kulturbedingungen zu erkennen. Ein histologischer Unterschied wird jedoch bei der Endothelzellschicht deutlich. Bei der nativen Karotis ist deutlich ein Monolayer an Zellen an der Innenseite der Gefäßwand zu erkennen. Diese deutet auf eine geschlossene Schicht von Endothelzellen hin. Die statisch kultivierte Karotis zeigt hingegen keine Endothelzellen auf ihrer Innenseite. Dem hingegen sind bei der im Kultursystem kultivierten Karotis deutlich Zellen auf der Innenseite der Gefäßwand zu erkennen, die eine geschlossene Schicht bilden. Morphologisch sind die native Karotis und die Bioreaktorkultur miteinander vergleichbar. Dieser Eindruck, den die H&E-Färbung vermittelt, wird durch die Immunfluoreszenzfärbung gegen die spezifischen Marker α SMA und CD31 bestätigt. Die native Karotis weist genau wie die Karotis aus der Bioreaktorplattform einen geschlossenen Monolayer an CD31 positiven Zellen auf, wohingegen keine positiven Zellen für CD31 bei der statischen Kultur zu erkennen sind. Des Weiteren lässt sich eine vergleichbar starke Expression des Markers α SMA in den tieferen Schichten des Gewebes der Bioreaktorplattform sowie der nativen Karotis beobachten. Bei der statischen Kultur ist lediglich eine sehr schwache Expression von α SMA zu erkennen.

Da bei der Bioreaktorkultur genau wie bei der nativen Karotis eine geschlossene Schicht von CD31 positiven Zellen vorhanden ist, deutet dies darauf hin, dass die Endothelzellschicht, die die Innenseite von Gefäßen überzieht bei der Bioreaktorkultur erhalten worden ist. Zur Überprüfung der Funktionalität der Endothelzellschicht in der Kultur der Bioreaktorplattform wurde eine Analyse zur Aufnahme von acetyliertem Lipoprotein niedriger Dichte (acLDL) vorgenommen (Abbildung 37).

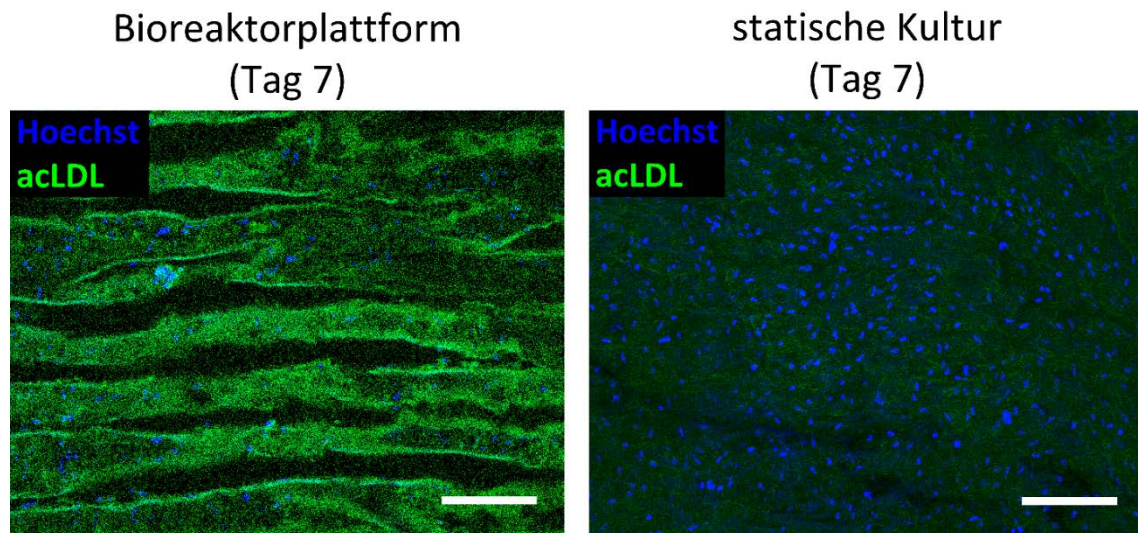


Abbildung 37: Funktionalität der dynamisch kultivierten Karotide

Als Funktionstest der Endothelzellen der dynamisch kultivierten Karotide wurde ein Test zur Aufnahme von acetyliertem Lipoprotein niedriger Dichte (acLDL) durchgeführt und mit der statischen Kontrolle verglichen. Die Endothelzellen der Kultur der Bioreaktorplattform zeigen eine 5-mal höhere Aufnahme des acLDL, verglichen mit der statischen Kultur. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μm .

Bei dem Gewebe, welches in dem Bioreaktorsystem kultiviert wurde, ist eine 5-mal so hohe Anreicherung von acLDL im Vergleich zur statischen Referenzkultur zu erkennen. Dies belegt, dass die oberste Zellschicht auf der Innenseite des Gefäßes aus Endothelzellen besteht, die ihre Funktionalität nicht verloren haben. Die niedrige Anreicherung von acLDL bei der statischen Kultur der Karotis deutet darauf hin, dass keine Endothelzellen mehr vorhanden sind.

3.5 Zellen für kardiales Tissue Engineering

In der Literatur werden diverse Zelltypen als mögliche Zellquelle für das kardiale Tissue Engineering genannt. Beispiele hierfür sind aus dem Zielgewebe isolierte adulte Zellen, adulte Stammzellen, embryonale Stammzellen, oder iPSCs, die aus adulten Fibroblasten generiert werden können. Da iPSCs aus den Fibroblasten des Patienten hergestellt und in unterschiedliche Zelltypen differenziert werden können, sind diese spenderspezifisch und in ausreichendem Maße verfügbar. Eine weitere Zellquelle für das kardiale Tissue Engineering, die von vielen Arbeitsgruppen herangezogen wird, sind die Kardiosphären abgeleiteten Zellen (CDCs). Diese können ebenso wie iPSCs aus kardialen Biopsien des Spenders generiert werden.

3.5.1 Kardiosphären abgeleitete Zellen

Die von 10 verschiedenen Spendern generierten CDCs wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zelle pro Quadratzentimeter auf der SISser ausgesät. Zur Vorbereitung der Matrix wurde vor dem Aussäen der Zellen auf der Matrix die Serosa abgezogen. Das besiedelte Zell-Matrix-Konstrukt wurde unter verschiedenen Kulturbedingungen kultiviert (Tabelle 9). Es wurde ein konstanter Fluss von 3,8 ml/min angelegt, ebenso wie ein pulsatile Fluss mit einem Druckunterschied von 120 mmHg zu 80 mmHg, welcher die physiologischen Druckbedingungen im menschlichen Körper nachahmen sollte. Als Kontrolle, welchen Einfluss die dynamische Kultur auf die Zellen hat, wurde eine statische Kultur neben den beiden dynamischen Kulturen im Bioreaktor durchgeführt. Für die statische Kultur wurde eine SISser ohne Serosa in eine sogenannte Zellkrone fixiert und in einer Multiwellplatte mit 6 Wells im Standardinkubator kultiviert.

Tabelle 9: Kultur von CDCs auf SISser unter verschiedenen Kulturbedingungen

	Zellzahl pro cm^2	Kulturbedingung
Gewebe 1	$1 \cdot 10^6$	konstanter Fluss von 3,8 ml/min
Gewebe 2	$1 \cdot 10^6$	physiologischer Druck von 120/80 mmHg
Gewebe 3	$1 \cdot 10^6$	statisch

Zur Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes der CDCs wurden H&E-Färbungen durchgeführt. Bei dem statisch kultivierten Konstrukt ist ein Multilayer der Zellen auf der Oberfläche der Matrix zu erkennen (Abbildung 38A). Im Gegensatz zu der statischen Kultur weisen die beiden dynamischen Kulturen nicht nur den Multilayer an der Oberfläche der Matrix auf, sondern es ist auch deutlich ein Migrationsverhalten der Zellen in die Matrix zu erkennen (Abbildung 38B, C). Bei einem zusätzlich angelegten pulsatilem Druckverlauf von 120/80 mmHg (Abbildung 38C) lässt sich ein Multilayer der Zellen, sowie in die Matrix eingewanderte Zellen erkennen. Daher wurden für alle weiteren Versuche diese Flussbedingungen gewählt.

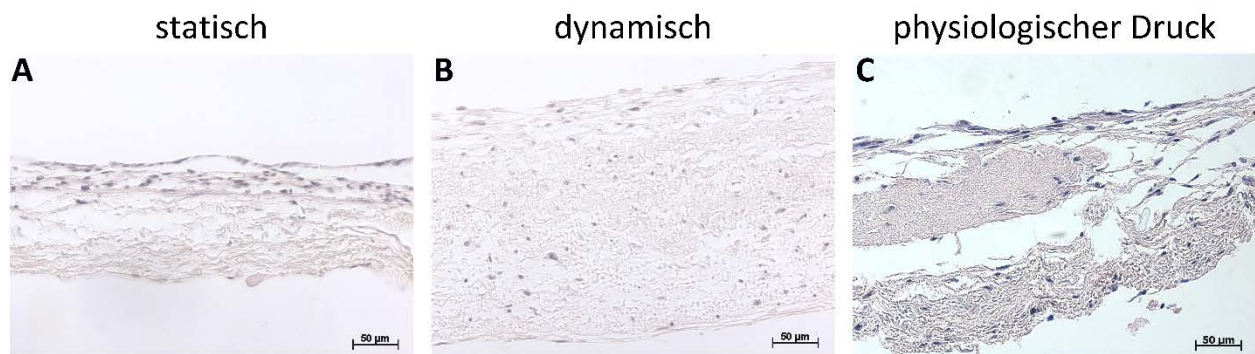


Abbildung 38: H&E-Färbung unterschiedlicher CDC-Kulturen

Unter statischen Bedingungen bilden die Zellen einen Multilayer auf der Oberfläche der Matrix aus (A). Bei dynamischen Flussbedingungen wie z.B. konstantem Fluss (B) oder pulsatilem Fluss mit einem Druckverhältnis von 120/80 mmHg (C), bilden die Zellen ebenfalls einen Multilayer an der Matrixoberfläche aus, migrieren jedoch auch in die Matrix. Die Zellen sind durch das rot gefärbte Zytoplasma, den blau gefärbten Zellkernen sowie ihre langgestreckte, aneinanderhängende Struktur zu erkennen. Der feinmaschigere, faserige, rötliche Bereich ist die Matrix.

In der Literatur ist beschrieben, dass die CDCs in Kardiomyozyten differenzieren können (30). Daher wurden verschiedene Protokolle zur Differenzierung der CDCs in Kardiomyozyten reproduziert. Die Protokolle zur Differenzierung der CDCs wurden aus der Differenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten adaptiert. Als Zusatz welcher die Differenzierung der Zellen induzieren sollte, wurde 5-Azacidine und Oxytocin eingesetzt.

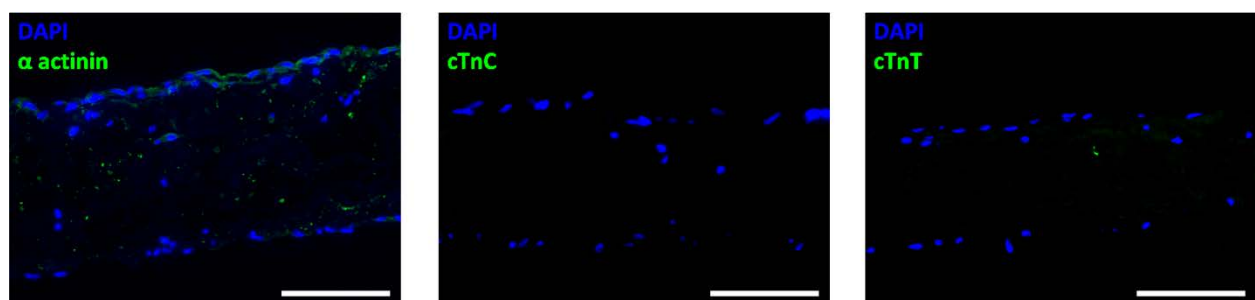


Abbildung 39: Kardiosphären abgeleitete Zellen, differenziert mit 5-Azacidine

CDCs wurden auf SISser ausgesät, mit 10 µM 5-Azacidine differenziert und für 14 Tage unter einem pulsativen Fluss mit einem physiologischen Druckprofil von 120/80 mmHg kultiviert. Immunfluoreszenzfärbung der spezifischen kardialen Marker α actinin, kardiales Troponin C und kardiales Troponin T zeigt keine Expression dieser Marker. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 100 µm.

Für den Differenzierungsansatz der CDCs in Kardiomyozyten mit 5-Azazidine wurden 5×10^5 CDCs auf die SISser ausgesät und für zwei Wochen pulsatil (120/80 mmHg) in einem Flussreaktor kultiviert. Das 5-Azacidine wurde in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen keine Expression der spezifischen kardialen Marker α actinin, kardiales Troponin C sowie kardiales Troponin T (Abbildung 39).

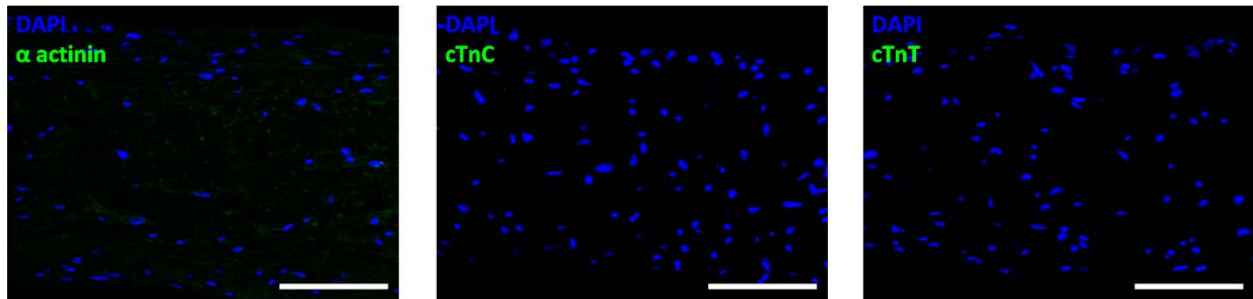


Abbildung 40: Kardiosphären abgeleitete Zellen differenziert mit Oxytocin

CDCs wurden auf SISser ausgesät, mit 10 nM Oxytocin differenziert und für 14 Tage unter einem pulsativen Fluss mit einem physiologischen Druckprofil von 120/80 mmHg kultiviert. Immunfluoreszenzfärbung gegen die spezifischen kardialen Marker α actinin, kardiales Troponin C und kardiales Troponin T zeigt keine Expression dieser Marker. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt $100 \mu\text{m}$.

Der zweite Differenzierungsansatz mit Oxytocin erfolgte vom Versuchsdesign gemäß dem Ansatz mit 5'-Azacytidine. Es wurde jedoch eine Konzentration von 10 nM Oxytocin eingesetzt. Die durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung des mit Oxytocin behandelten Konstrukts zeigt ebenfalls keine Expression der spezifischen kardialen Marker α actinin, kardiales Troponin C sowie kardiales Troponin T (Abbildung 40).

Anhand dieser Ergebnisse kann der Schluss gezogen werden, dass die CDCs die SIS als Matrix nutzen und auch mit der Stimulation durch den Fluss im Bioreaktor gewebeähnliche Konstrukte ausbilden können. Die Differenzierung der CDCs auf der Matrix in funktionelle Kardiomyozyten kann nicht mit der Zugabe von 5-Azacytidine oder Oxytocin erreicht werden.

3.5.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Als weitere Zellquelle für den Aufbau eines funktionellen Herzmuskelgewebes wurden induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) verwendet. Diese Zellen können aus Fibroblasten der Haut eines Spenders mittels den Yamanaka-Faktoren oder mit Hilfe von Small Molecules generiert werden. Für die gezeigten Versuche wurden iPSCs benutzt, welche von der Arbeitsgruppe von Prof. Edenhofer

reprogrammiert (76) und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Die Ausgangszelle für die Reprogrammierung war ein Fibroblast aus der humanen Haut. Die Differenzierung der iPSCs in Kardiomyozyten erfolgte mit Small Molecules und wurde ebenfalls von der Gruppe von Prof. Edenhofer übernommen (36).

3.5.2.1 Mono-Kultur

Als Grundgerüst für den Aufbau eines funktionellen Herzmuskelgewebes diente die SISser. Bevor die SISser mit den iPS-Zellen abgeleiteten Kardiomyozyten besiedelt wurde, wurde der Matrixschlauch der Länge nach aufgeschnitten und die Serosa mit Pinzetten abgezogen. Die präparierte SISser wurde in eine Zellkrone eingespannt (Abbildung 6) und mit $1,5 \cdot 10^6$ Kardiomyozyten besiedelt. Im Anschluss an die Besiedlung wurde die Matrix in einer 6-Well-Platte für eine halbe Stunde in den Inkubator gegeben, um die Zellen auf den Scaffold adhären zu lassen. Nach dieser Inkubationszeit wurde ein Milliliter Medium in die Zellkrone und 5 ml Medium außen um die Zellkrone gegeben. Das Medium welches für die Kulturdauer des Konstrukts verwendet wurde, war RPMI GlutaMAX™ mit 2 % B27. Die Kultur des zellbesiedelten Scaffolds erfolgte für 2 Wochen unter statischen Bedingungen, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. Drei Tage nach Beginn der Kultivierung konnte beobachtet werden, dass die Kardiomyozyten begonnen hatten sich zu kontrahieren. Die Begutachtung des Zell-Matrix-Konstrukt nach der zweiwöchigen Kultur erfolgte durch histologische Färbungen von Paraffinschnitten. Eine Hämatoxilin und Eosin Färbung zeigt, dass sich die Kardiomyozyten nicht gleichmäßig in einem Multilayer über die ganze Fläche der Matrix verteilt haben (Abbildung 41). Sie bildeten Cluster an der Oberfläche der SISser. Ebenso ist zu erkennen, dass die Zellen vereinzelt begonnen haben in die Matrix einzuwandern.

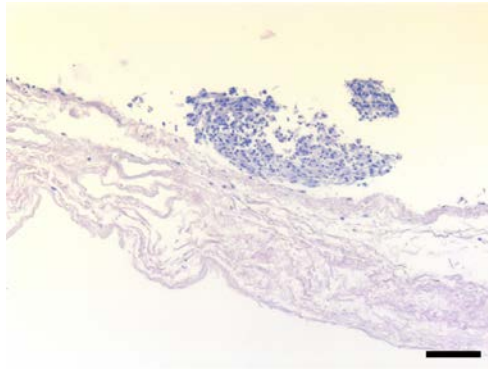


Abbildung 41: Morphologie der Mono-Kultur von iPS abgeleiteten Kardiomyozyten auf der SISser

Es wurden $1,5 \cdot 10^6$ iPS abgeleitete Kardiomyozyten auf einer SISser ausgesät. Die H&E-Färbung stellt das Zytoplasma sowie die Matrix in rot und die Zellkerne in blau dar. Eine zweiwöchige statische Kultur zeigt, dass sich die Zellen in Clustern auf der Oberfläche der Matrix zusammenlagern und die Oberfläche somit nicht flächendeckend überziehen. Vereinzelt beginnen Zellen in die Matrix einzuwandern. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt 100 μm .

Zur Untersuchung, ob der Aufbau der Zellcluster funktionellem Herzmuskelgewebe entspricht, wurden immunhistologische Färbungen gegen spezifische kardiale Marker angefertigt (Abbildung 42).

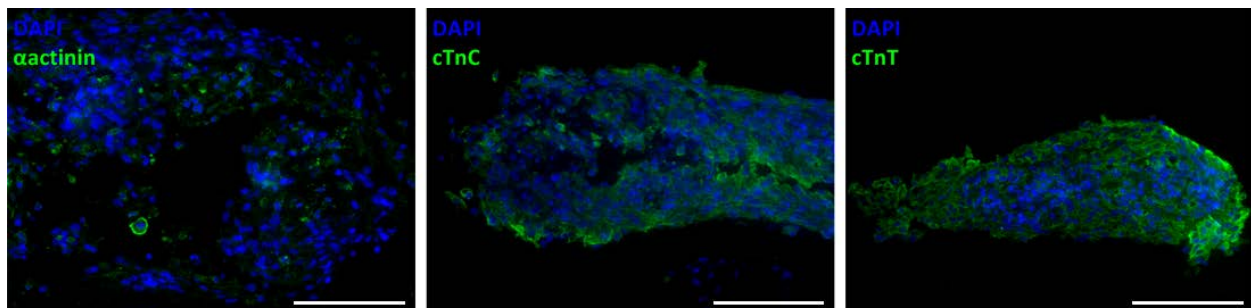


Abbildung 42: Expression kardialer Marker der Mono-Kultur auf der SISser.

Eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellcluster auf der SISser gegen den spezifischen kardialen Marker α actinin zeigt eine schwache Färbung des Proteins. Für die kardialen Marker cTnC und cTnT ist jeweils eine starke Färbung und somit eine hohe Expression des Proteins zu erkennen. Die jeweiligen spezifischen Marker sind an der grünen, die Zellkerne an der blauen Färbung zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen α actinin zeigt eine Färbung von ca. 40 % der Zellen in dem Zellcluster. Bei den spezifischen kardialen Markern cTnC und cTnT ist eine hohe Expression des jeweiligen Proteins zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Kardiomyozyten nach der Kultur auf der SISser ihre Funktionalität beibehalten haben.

Für den Aufbau eines funktionellen Herzmuskelgewebes ist eine solche Zellanordnung in Clustern, wie in der Mono-Kultur, nicht geeignet, da die Cluster untereinander nicht verbunden sind und somit keine Signalweiterleitung und damit verbunden keine gerichtete Kontraktion erfolgen kann. Des Weiteren entspricht die Zusammensetzung des Gewebes nicht der tatsächlichen Physiologie, da bei diesem Versuch nur ein Zelltyp, Kardiomyozyten, verwendet wurde. Damit der physiologische Aufbau des Herzgewebes besser nachgeahmt wird, wurde eine Co-Kultur mit weiteren herzspezifischen Zelltypen durchgeführt.

3.5.2.2 Co-Kultur

Ein menschliches Herz besteht aus mehreren Zelltypen, was es zu einem sehr komplexen Gewebe macht. Zur Nachbildung der *in vivo* Situation und um der Clusterbildung der Zellen auf der Matrixoberfläche entgegen zu wirken, wurden Co-Kulturen mit anderen Zelltypen gemacht. Als weitere Zellarten wurden Fibroblasten, welche aus Herzbiopsien gewonnen wurden, und mesenchymale Stammzellen für die Co-Kultur ausgesucht. Die Fibroblasten wurden ausgewählt, da sie aus Herzbiopsien gewonnen werden können und somit schon in einem Herzgewebeverbund lokalisiert sind und einen großen Teil des stromalen Anteils des Herzgewebes ausmachen. Der Grund für die Auswahl der mesenchymalen Stammzellen als weiterer Zelltyp ist die Beschreibung in der Literatur, dass sie einen positiven Effekt auf die Herzregeneration haben (77, 78). Anhand dieser Tatsachen wurde die Co-Kultur der Kardiomyozyten mit diesen beiden weiteren Zelltypen durchgeführt.

Die Besiedlung und die Kultivierung des Konstrukts erfolgten analog zu der der Mono-Kultur. Alle drei Zellarten wurden gemischt und in einem Verhältnis von 1:1:1 auf der Matrix ausgesät. Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ Kardiomyozyten, $0,5 \cdot 10^6$ Fibroblasten und $0,5 \cdot 10^6$ MSCs verwendet. Wie bei der Mono-Kultur konnte auch hier nach drei Tagen eine Kontraktion der Kardiomyozyten, sowie des gesamten Scaffolds beobachtet werden. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die gleichen Färbungen durchgeführt. Eine Wiederholung dieser Co-Kultur erfolgte 10-mal.

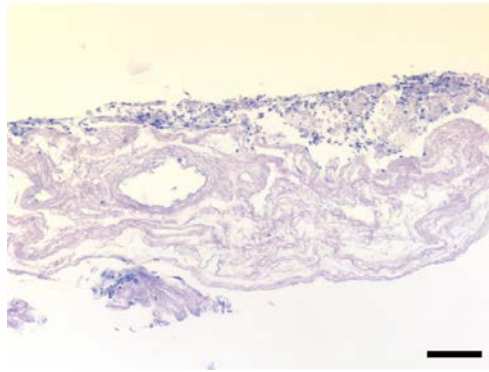


Abbildung 43: Morphologie der Co-Kultur von iP_S abgeleiteten Kardiomyozyten, auf der SISser

Auf einer SISser wurden $0,5 \cdot 10^6$ Kardiomyozyten, $0,5 \cdot 10^6$ Fibroblasten und $0,5 \cdot 10^6$ mesenchymale Stammzellen als Co-Kultur ausgesät. Nach zweiwöchiger, statischer Kultur ist ein durchgängiger Multilayer von Zellen, Cytoplasma rot, Zellkerne blau angefärbt, auf der Oberfläche der Matrix erkennbar. Vereinzelt beginnen Zellen in die Matrix einzuwandern. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt $100 \mu\text{m}$.

Die H&E-Färbung der Co-Kultur zeigt einen geschlossenen Multilayer der Zellen auf der Oberfläche der Matrix (Abbildung 43). Vereinzelt sind Zellen dabei in die Matrix einzuwandern. Zur Untersuchung, ob sich durch die Co-Kultur ein funktionales kardiales Gewebe ausgebildet hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen die spezifischen Marker α actinin, cTnC und cTnT angefertigt (Abbildung 44).

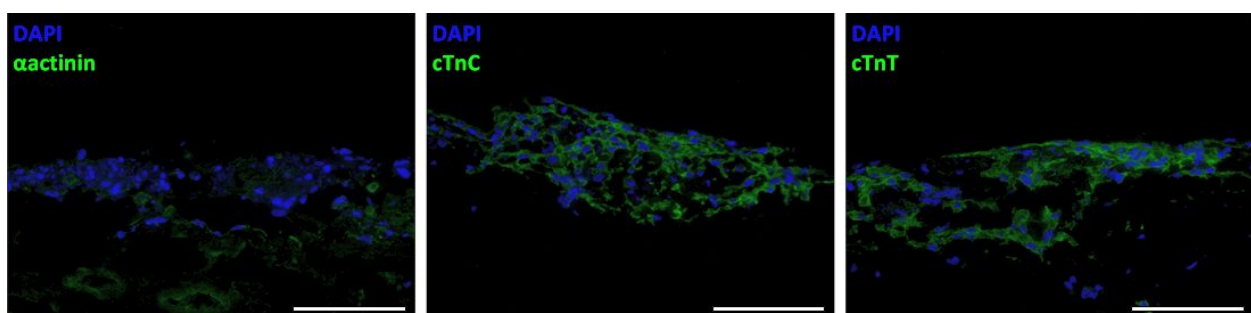


Abbildung 44: Expression kardialer Marker der Co-Kultur auf der SISser.

Immunfluoreszenzfärbung gegen α actinin zeigt eine schwache Färbung der Zellen auf der Matrix. Dem hingegen ist eine deutliche Färbung der Zellen gegen die kardialen Marker cTnC und cTnT zu erkennen. Die jeweiligen spezifischen Marker sind an der grünen, die Zellkerne an der blauen Färbung zu erkennen. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von $100 \mu\text{m}$.

Immunfluoreszenzfärbung der Co-Kultur auf der SISser gegen α actinin zeigt eine Färbung von ca. 40 % der Zellen, wie bei der Mono-Kultur. Insgesamt sieht die Färbung schwächer aus, was aufgrund der

Verdünnung der Kardiomyozyten durch die Fibroblasten und den mesenchymalen Stammzellen hervorgerufen sein worden kann und dass die Zellen bei der Co-Kultur keine Cluster, sondern einen Multilayer bilden. Bei den Färbungen gegen die spezifischen kardialen Marker cTnC und cTnT ist eine Färbung von ca. 80 % der Zellen zu erkennen.

Die Co-Kultur unterscheidet sich von der Mono-Kultur nicht nur in der Morphologie des Zellmatrixkonstruktes, sondern auch in der Frequenz der Kontraktionen. Für die Co-Kultur können 60 Kontraktionen pro Minute beobachtet werden, was einer Frequenz von 1 Hz und somit dem physiologischen Herzschlag entspricht. Bei der Mono-Kultur hingegen beträgt die Frequenz der Kontraktionen 0,5 Hz.

4 Diskussion

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld in welchem Ingenieurwissenschaften, Materialwissenschaften und die Biologie zusammenarbeiten, um Organe und Gewebe des menschlichen Körpers in ihrem physiologischen Zustand nachzubilden. In dieser Promotionsarbeit werden alle drei genannten Bereiche zur Entwicklung von Technologien genutzt, die als Grundlage für die Herstellung von Geweben mit dem Fokus auf das kardiovaskuläre Tissue Engineering dienen.

In das Gebiet der ingenieurwissenschaftlichen Arbeiten fielen die Entwicklung einer Azellularisierungswand, eines Inkubators sowie einer Bioreaktorplattform. Die Pumpenwand wurde mit fünf computergesteuerten Pumpen ausgestattet, welche über einen Regelkreis des vorherrschenden Drucks im System geregelt werden. Diese Wand dient dazu natives Gewebe über Perfusion des Gefäßsystems zu dezellularisieren. Des Weiteren ist in dieser Arbeit ein Inkubatorsystem aufgebaut worden, welches die Kultur von Zell-Matrix-Konstrukten mit komplexen, hoch spezialisierten Bioreaktoren ermöglicht und erleichtert. Ebenso wurde ein modulares Bioreaktorsystem entwickelt, welches ein kompaktes, flexibles Kultursystem darstellt und sehr gut für die Parallelisierung von Versuchsansätzen geeignet ist.

Der Schwerpunkt der Materialwissenschaften lag auf der Entwicklung einer Elektrospinninganlage. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Anlage erfolgte durch das Spinnen geeigneter Matrices für das kardiale Tissue Engineering aus Polycaprolacton-Lösungen verschiedener Konzentrationen, gelöst in verschiedenen Lösungsmitteln beziehungsweise mit unterschiedlichen Zusätzen.

Durchgeführte biologische Arbeiten dienten der Validierung des modularen Bioreaktorsystems. Ebenfalls wurden kardiale Zellen auf die elektrogesponnenen Matrices ausgesät, um deren Biokompatibilität zu überprüfen. Als ein weiterer großer Punkt im Bereich der Biologie wurde begonnen, ein Konstrukt aufzubauen, welches als Testsystem für kardiale Anwendungen eingesetzt werden kann und dem physiologischen Aufbau von Herzmuskelgewebe entspricht.

4.1 Mechanische Peripherie für das Tissue Engineering

Das Tissue Engineering benötigt für die Umsetzung der biologischen Ansätze zur Entwicklung von Geweben einige technische Anlagen. Die in dieser Arbeit entwickelten Anlagen helfen bei der Erzeugung geeigneter Matrices sowie bei deren Kultivierung nach der Besiedlung mit Zellen und der Reifung des Gewebes.

4.1.1 Dezellularisierungswand

Bei der Dezellularisierung von Geweben kommen verschiedenste Verfahren zum Einsatz. Das einfachste Verfahren dabei ist, das Gewebe, welches dezellularisiert werden soll, in die Dezellularisierungslösung einzulegen und auf einem Wippschüttler zu inkubieren (79). Diese Methode ist für besonders dünne Gewebe, wie die SISser oder die Harnblase geeignet (80), da die Dezellularisierungslösung nur mittels Diffusion in das Gewebe eindringt und die Zellen herauslöst. Für die Dezellularisierung des Schweinedarms zur Herstellung der SISser ist diese Methode vollkommen ausreichend (Abbildung 7), da die Dicke der Darmwand des Schweinedarmes nur ein paar hundert Mikrometer beträgt und somit die Dezellularisierungslösung ungehindert in das Gewebe diffundieren kann.

Bei Geweben mit einer Dicke von mehreren Millimetern muss die Dezellularisierungslösung aktiv in das Gewebe eingebracht werden, damit die Zellen aus ihrem Verbund ausgelöst und ausgeschwemmt werden können. Damit dies erfolgen kann, wird bei solchen Geweben in der Regel versucht das Gefäßsystem zu kanülieren, um auf diese Weise die Dezellularisierungsflüssigkeit in das Gewebe zu bringen. Dieser Prozess des Perfundierens kann auf verschiedene Arten erfolgen. Einige Gruppen stellen Reservoirflaschen, welche die Dezellularisierungsflüssigkeit beinhaltet, auf ein gewisses Höhenniveau, um so mittels des eingestellten hydrostatischen Drucks das Gewebe zu perfundieren (53). Bei dieser Methode muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Reservoirflasche nicht leerläuft und somit Blasen in das Gefäßsystem gedrückt werden, welche die kleinen Gefäße blockieren können und dadurch eine vollständige Dezellularisierung des Gewebes verhindern. Eine weitere Möglichkeit ist der Eintrag der Dezellularisierungsflüssigkeit mittels Pumpen (73). Unter der Verwendung von Pumpen kann die Lösung entweder mit einer bestimmten Flussrate (81) durch das Gewebe gepumpt werden, oder es kann ein bestimmter Druck (82) beaufschlagt werden. Durch das Einfügen von Regelkreisen in die Programmierung der Pumpensteuerung kann die Pumpe so geregelt werden, dass der gewünschte Parameter konstant gehalten wird. Ebenfalls kann durch den Einsatz von Pumpen ein Kreislaufsystem etabliert werden, was ein fortwährendes Kontrollieren und manuelles Nachfüllen der Reservoirflasche erübrigt. Da das porcine Herz ein äußerst festes und dickes Gewebe ist, wurde für die in dieser Arbeit ausgeführten Dezellularisierungsversuche des Herzens, die Perfusion mittels eines pumpengetriebenen Kreislaufsystems gewählt. Dafür wurde eine sogenannte Dezellularisierungswand, welche aus fünf fest eingebauten Peristaltikpumpen besteht, genutzt. Jede Pumpe ist mit einem Drucksensor verbunden. Die Steuerung beinhaltet einen Regelkreis, welcher ständig den Druck im Kreislaufsystem über den Drucksensor abfragt. Dadurch ist es möglich, über die Steuerung einen gewünschten, oder physiologischen Druck im System einzustellen, welcher über den kompletten Prozess konstant gehalten

wird. Nach einem Zeitraum von ca. 14 Tagen ist das porcine Herz unter Einsatz von Natriumdeoxycholat komplett dezellularisiert. Dank des Kreislaufsystems muss in den Prozess nur zum Austausch der Lösungen eingegriffen werden.

Die Prüfung der Zuverlässigkeit der Dezellularisierungswand sowie deren Validierung erfolgten mit der Dezellularisierung von porcinen Herzen. Das Herzen wurden aufgrund der Tatsache ausgewählt, dass das Herz ein sehr komplexes Organ darstellt. Es besteht aus mehreren Kompartimenten, welche von Muskelgewebe unterschiedlicher Dicke umgeben sind. Für einen Dezellularisierungsprozess stellt solch ein Gewebe eine Herausforderung dar, da der Eintrag der Dezellularisierungslösung in ein dichtes, kompaktes und festes Gewebe, wie dem Muskelgewebe, schwierig ist. Des Weiteren verfügt das Herz über ein komplexes Gefäßsystem, über welches das Organ mit der Dezellularisierungslösung perfundiert werden kann. All diesen Eigenschaften machen das Herz zu einem komplexen Gewebe. Wenn es gelingt das Herz mit Hilfe der Dezellularisierungswand vollständig zu dezellularisieren, ist dieses System auch für den Einsatz bei weniger komplexen Geweben geeignet.

Die Dezellularisierung der Herzen erfolgte über eine druckgeregelter Perfusion. Der Vorteil einer druckgeregelten Perfusion liegt darin, dass über den gesamten Prozess ein physiologischer Druck im Gewebe herrscht und somit die Struktur des Gewebes nicht unnatürlich belastet wird und Schaden nimmt. Einige Gruppen führen die Dezellularisation von Geweben mit konstantem Fluss durch. Bei diesem Verfahren besteht jedoch die Gefahr, dass das Gewebe durch den Fluss eine zu hohe mechanische Beanspruchung erfährt und dadurch die Strukturen der Matrix zerstört werden. Wird jedoch ein geringer Fluss eingesetzt, welcher einen physiologischen Druck im Gewebe erzeugt, so wird der Druck über den gesamten Dezellularisierungsprozess im Gewebe zu gering, um die Zellen aus ihrem Matrixverbund auszuspülen. Dies kann durch die druckgeregelter Perfusion behoben werden. Die Versuche in dieser Arbeit wurden mit einem Solldruck von 100 mmHg durchgeführt und das Herz mit diesem Druck über das Gefäßsystem mit Dezellularisierungslösung perfundiert. Mit diesen technischen Einstellungen sind 20 native Schweineherzen behandelt worden, wobei eine Überprüfung der Technik sowie eine Anpassung beziehungsweise Optimierung des Dezellularisierungsprozesses nach jedem Dezellularisierungslauf durchgeführt wurde. Bei den letzten Herzen (Abbildung 10) kann die Zellfreiheit der Matrix sowie der intakte Aufbau der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden, was eine erfolgreiche Dezellularisierung dieser Herzen zeigt. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist die Dezellularisierungswand für die Dezellularisierung von Geweben und Organen geeignet und einsatzbereit.

4.1.2 Inkubator

Für die Zellkultur und das Tissue Engineering ist der Inkubator eine der wichtigsten Komponenten. Er schafft eine klimatische Umgebung, welche der physiologischen Begebenheit entspricht, die die Zellen für ihr Wachstum benötigen. Die Standardinkubatoren für Zellkultur haben im Innenraum Einlegeböden und sind in einigen Fällen in Fächer unterteilt. Diese Ausstattung ist speziell für die Kultivierung von Zellen in Zellkulturgefäßen wie Kulturflaschen, Well-Platten oder Petrischalen ausgelegt. All diese Kulturbedeälter werden nicht perfundiert oder bewegt. Da allerdings im Tissue Engineering häufig Bioreaktoren zum Einsatz kommen, in denen das eingespannte Gewebe perfundiert werden soll, ist eine Pumpe notwendig. In herkömmlichen Brutschränken ist keine Pumpe für solche Zwecke integriert. Des Weiteren ist auch keine Stromversorgung für die Pumpe im Innenraum des Inkubators installiert, was zur Folge hat, dass das Stromkabel der Pumpe nach außen geführt werden muss, wodurch es sein kann, dass die Tür des Inkubators nicht mehr vollständig schließt und es somit zu einer Temperaturabsenkung im Brutschrank kommt (75, 83). Ebenso geht der Betrieb eines Bioreaktors häufig mit dem Einsatz von Silikonschläuchen, welche die einzelnen Komponenten des Kulturkreislaufes miteinander verbinden und dem Einsatz von Sensoren zur Überwachung der Kulturbedingungen, einher. Die Kombination aus der Pumpe, den Schläuchen, dem Bioreaktor und sonstigen benötigten Komponenten, die im Inneren des Inkubators platziert werden müssen, führt zu einem unverhältnismäßig großen Verlust an Stellfläche im Brutschrank. Des Weiteren wird der Aufbau mit all den Komponenten auf solch engem Raum unübersichtlich und das Entnehmen von Proben ist erschwert. Bei einigen Modellen ist es zwar möglich, die Silikonschläuche durch ein verschließbares Loch an der Rückwand des Inkubators nach außen zu führen, um die Pumpe außerhalb des Inkubators zu platzieren. Das kann jedoch zu einem Abkühlen des Mediums führen, während es außerhalb des Inkubators durch den Silikonschlauch fließt und somit zu einer Beeinflussung der Kulturparameter sowie der Zellen (84).

Zur Behebung all dieser Probleme wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Stand-Alone Inkubatorsystem (Abbildung 19) entwickelt, welches vermehrt den Anforderungen des Tissue Engineerings beziehungsweise dem Betrieb von Bioreaktoren entspricht. Einige Gruppen haben ebenfalls Inkubatorsysteme für den Einsatz in der Zellkultur oder im Tissue Engineering entwickelt. Jedoch sind diese zumeist für hochspezialisierte Anwendungen (85) oder für den Betrieb von mikrofluidischen Chips (86) designt. Der Aufbau dieser Reaktorsysteme erlaubt ausschließlich den Einsatz für ihr spezielles Kultursystem.

Das in dieser Arbeit aufgebaute System ist flexibel einsetzbar und für jegliche Art von Bioreaktoren, welche perfundiert werden müssen, geeignet. Bei diesem Inkubatorsystem wurde eine Peristaltikpumpe

so integriert, dass nur der Pumpkopf in den Innenraum der Inkubatorkammer ragt. Somit steht im Innenraum mehr Platz für Bioreaktoren und deren Komponenten zur Verfügung. Das System hält genau wie die Standardinkubatoren eine physiologische Temperatur von 37 °C und ein CO₂-Level von 5 %. Sensoren zur Überprüfung und Regelung der Temperatur und des CO₂-Gehalts sind an der Rückwand des Inkubators platziert. Daher erfüllt das System die grundlegenden Anforderungen für die Zellkultur ebenso wie ein Standardinkubator. Des Weiteren ist ein Drucksensor im Inkubationsraum verfügbar, welcher an den Kulturkreislauf angeschlossen werden kann. Damit können die gewählten Druckeinstellungen für das System überprüft und die Pumpe via Regelkreise geregelt werden. Die Einstellungen für die Pumpe beziehungsweise den Druck werden über ein Bedienpanel an der Außenseite des Inkubators vorgenommen. Somit muss im Gegensatz zu einem Standardinkubator der neuentwickelte Inkubator für eine Änderung der Kulturparameter nicht geöffnet werden.

4.1.3 Bioreaktorplattform

Der oben beschriebene Inkubator ist ein erster Fortschritt angesichts der Flexibilität und der Vielseitigkeit der Anwendungen im Tissue Engineering, jedoch ist er mit den Abmessungen 147 x 68 x 92 cm verhältnismäßig groß und eine Parallelisierung mehrerer Ansätze ist limitiert durch die Anzahl der Steckplätze für Pumpschläuche an der Pumpe. Zur Überwindung dieser Limitierungen, wurde im Rahmen dieser Arbeit, basierend auf der Inkubatortechnologie eine modulare Bioreaktorplattform entwickelt, welche die gleichen Möglichkeiten wie der Stand-Alone Inkubatorschrank bietet. Diese Plattform stellt ein kompaktes System dar, welches lediglich ein Fünftel des Platzbedarfes des Inkubatorschranks benötigt. Im Vergleich zum Inkubatorschrank muss kein mit Luft gefüllter Inkubatorraum erwärmt werden. Des Weiteren sinkt die Temperatur in den Inkubatoren ab, sobald deren Tür geöffnet wird und kühlere Umgebungsluft in den Inkubatorraum strömt. Da dieser Raum bei der Plattform entfällt, ist sie energiesparender als der Inkubatorschrank. Zudem bietet die Reaktorplattform die Möglichkeit der Parallelisierung der Versuche mit Hilfe eines Racksystems.

Anhand der Charakterisierung sowie Validierung der einzelnen Komponenten konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Komponenten die Anforderungen für eine Anwendung im Tissue Engineering erfüllen (87). Die Beutelpumpe ist in der Lage einen physiologischen Fluss sowie das charakteristische Druckprofil des physiologischen Blutdrucks zu erzeugen. Weiterhin vermindert das Pumpenkonzept einer Beutelpumpe den Scherstress auf die Wachstumsfaktoren oder auf Zellen im Medium. Wachstumsfaktoren können aufgrund des Scherstress, den Peristaltikpumpen auf das Medium ausüben, ausfallen und somit inaktiviert werden (88). Ebenso können im Medium flotierende Zellen, wie zum Beispiel Immunzellen, durch den Kopf einer Rollerpumpe zerdrückt werden. Dies kann durch den

Einsatz einer Beutelpumpe vermieden werden. Mit Hilfe des Wärmetauschers kann das Kulturmedium innerhalb eines kurzen Zeitraums auf die physiologische Temperatur von 37 °C erwärmt und über den gesamten Kulturzeitraum von mehreren Wochen konstant gehalten werden. Der Gasaustauscher besitzt in der hier angewandten Modifikation ein größeres Potential als die herkömmlichen Luftfilter, die standardmäßig bei Kulturen in einem normalen CO₂-Inkubator bei solchen Anwendungen zum Einsatz kommen.

Die Funktion der Plattform als gesamtes System wurde durch die Kultur porziner Karotiden nachgewiesen, beziehungsweise validiert. Dafür wurde eine native Karotis, welche in einer Gewebekammer aufgehängt war, in den Flüssigkeitskreislauf integriert und für 7 Tage im Gesamtsystem dynamisch kultiviert. Nach dieser Kulturzeit erfolgten die Entnahme der Karotis sowie deren Untersuchung mittels immunhistologischen Färbungen unter Gegenüberstellung zu einer statisch kultivierten Karotis. Im Vergleich zu einer statischen Kultur zeigt die in der Bioreaktorplattform kultivierte Karotis nach der Kultur immer noch die native Morphologie mit den vielschichtigen glatten Muskelzellen unter der Schicht der Endothelzellen (Abbildung 36), die auf der Innenseite der Arterie angelagert sind. Weiter zeigen die Endothelzellen der Innenseite der Arterie ihre Funktionalität durch die hohe Aufnahme des acetylierten Lipoproteins geringer Dichte, verglichen mit der statisch kultivierten Karotide (Abbildung 37). Der Unterschied im Erscheinungsbild der Schicht der Endothelzellen zwischen den nativen und den in der Bioreaktorplattform kultivierten Karotiden kann sich aufgrund des rheologischen Unterschieds zwischen Medium und Blut ausgebildet haben (89). Des Weiteren können auch der unterschiedliche Scherstress, der auf die Zellen wirkt, sowie der Transport von Nährstoffen und Metaboliten die Zellen beeinflussen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bioreaktorplattform die nativen Umgebungsbedingungen nachahmen und das Gewebe am Leben erhalten werden kann. Somit ist belegt, dass die Bioreaktorplattform als Gesamtsystem für das Tissue Engineering komplexer Gewebe geeignet ist.

Die Idee modulare Plattformen im Bereich des Tissue Engineerings einzusetzen gibt es schon seit vielen Jahren. Im Jahr 2005 reichten Smith et al. (90) ein Patent für eine Plattform ein, welche Module für die Isolation und Proliferation von Zellen sowie für die Reifung des Gewebes beinhaltet.

Auch in den letzten Jahren wurden viele modulare Reaktorsysteme entwickelt. Allerdings verfolgen die meisten einen spezifischen Hintergrund (91, 92). Lovett et al. (91) zum Beispiel entwickelten ein System zur Messung des Sauerstoffgehaltes während der Kultur. Dieses System kann ausschließlich für den Aufbau von Gefäßen und nicht ohne großen Aufwand für andere Anwendungen eingesetzt werden. Andere wiederum sind für eine breitere Anwendung konzipiert und erlauben eine Parallelisierung der

Versuchsansätze wie zum Beispiel das System von Desmoulin et al. (93). Jedoch benötigen die Systeme weiterhin die Unterstützung von Laboreinrichtungen, wie zum Beispiel einen Standardinkubator in den diese gestellt werden müssen. Zwar können ein paar Einheiten, wie zum Beispiel eine Einheit zum Erwärmen des Mediums oder Blutpumpen kommerziell erworben und extern zugefügt werden, wodurch der Inkubator ersetzt werden kann, allerdings führt dies wiederum zu einem erhöhten Platzbedarf.

Bisher gibt es nur einzelne Systeme, die die Anforderungen Anwenderfreundlichkeit, niedrige Kosten und Flexibilität vereinen. Die in dieser Arbeit entwickelte Bioreaktorplattform benötigt keine zusätzlichen Geräte, was erheblich zur Bedienerfreundlichkeit beiträgt. Alle Teile des Flüssigkeitskreislaufs, welche in Kontakt mit Medium kommen, sind aus günstigen Komponenten aufgebaut und können nach dem Gebrauch verworfen werden. Die Verbindung aller Teile miteinander erfolgt durch Standard-Luer-Lock-Verbinder ein. Solche Verbinder machen das System äußerst flexibel, da durch die Verbinder die Einheiten in der gewünschten, beziehungsweise erforderlichen Reihenfolge zusammengestellt werden können. Somit können auch weitere Module eingefügt oder weggelassen werden.

Das komplette System mit all seinen Komponenten ist sehr klein und kompakt. Es findet auf einer Fläche von 400 x 400 mm Platz und hat eine maximale Höhe von 250 mm. Aufgrund dieser Abmessungen kann das System ohne Probleme in ein Rack gestellt werden, um mehrere Ansätze parallel durchführen zu können.

Anhand all dieser Eigenschaften und Merkmale erfüllt das System die angestrebte Flexibilität und Bedienerfreundlichkeit. Die Kosten für das System sind niedrig, da ausschließlich Standardkomponenten, welche von der Anschaffung sehr billig sind, verwendet werden. Ebenfalls ist das System für die Anwendung in Bereichen des GMP geeignet, da der Flüssigkeitskreislauf nach dem Verbinden aller Komponenten und der Sterilisation im zusammengebauten Zustand ein geschlossenes System ist und es somit keine Gefahr für Kontaminationen gibt.

4.2 Matrix für Tissue Engineering

Das Ziel des Tissue Engineerings ist es funktionelles Gewebe zu züchten. Dieses Gewebe kann in Testsystemen Anwendung finden, mit deren Hilfe die Pharma- und Kosmetikindustrie Substanzen testet (94). Als Ziel des Tissue Engineering ist jedoch der Einsatz der entwickelten Gewebe als Implantat anzusehen (95), um degeneriertes Gewebe zu ersetzen. Damit die Gewebe als Implantat eingesetzt werden können, müssen diese dem nativen Gewebe in möglichst hohem Grad entsprechen. Damit solch ein gewebespezifischer Aufbau möglich ist, ist eine dreidimensionale Struktur des Konstrukts notwendig.

Zur Unterstützung der Zellen bei der Bildung von dreidimensionalem Gewebe, sind Trägerstrukturen erforderlich, auf die die Zellen ausgesät werden (96). Diese Matrizes können aus den verschiedensten Materialien bestehen. Des Weiteren können diese Trägerstrukturen in den verschiedensten Formen genutzt werden, zum Beispiel als Gele oder als Nanofasercscaffolds. Gele kommen häufig zum Einsatz, wenn es darum geht, Gewebe aufzufüllen, biologisch aktive Moleküle freizusetzen oder Zellen gezielt in einen Defekt einzubringen (97). Nanofasercscaffolds werden für den Aufbau von Geweben eingesetzt, die mechanischer Belastung ausgesetzt sind, beziehungsweise eine gerichtete Orientierung der Zellen voraussetzen, wie Blutgefäße, Nervenstränge, Sehnen oder Muskeln (98). Je nachdem welche mechanischen Eigenschaften bei der jeweiligen Art des Gewebes benötigt werden. Für einen größt möglichen Erfolg im Bereich Tissue Engineering sind hoch spezialisierte Trägerstrukturen nötig, die die Zellen unterstützen (47).

4.2.1 Elektrogenespinnene Matrix

Für die Produktion von definierten sowie reproduzierbaren Scaffolds wird das Elektrospinnen als Methode eingesetzt. Mit dieser Technik können Matrizes erzeugt werden, welche verschiedene Faserdurchmesser vom Nano- bis zum Mikrometerbereich aufweisen (99). Des Weiteren können mittels einer rotierenden Rolle, welche als Kollektorelektrode bei der Elektrospinningapparatur eingesetzt wird, die Fasern parallel zueinander ausgerichtet werden. Damit Matrizes mit parallel ausgerichteten Fasern mit der in dieser Arbeit entwickelten Elektrospinninganlage erzeugt werden konnten, musste diese für eine solche Anwendung validiert werden. Für die Validierung der Anlage wurden Matrizes aus den verschiedenen Lösungen (siehe Absatz 3.2.2.1) gesponnen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Geschwindigkeit von 32 km/h der Kollektorelektrode ausreicht, damit sich die Fasern parallel zueinander anlagern, unabhängig von den eingesetzten Polymerlösungen. Zur Überprüfung der Geschwindigkeit der Kollektorelektrode ist ein Fahrradcomputer eingesetzt worden.

Die parallele Ausrichtung der Fasern entspricht annähernd der Ausrichtung der Fasern in der nativen extrazellulären Matrix des Herzens (100). Safaeijavan et al. (101) beobachteten eine höhere Expression von kardialen Markern bei differenzierten Stammzellen, welche auf einer elektrogenespinnenen Matrix aus Polycaprolacton mit parallel angeordneten Fasern kultiviert wurden, verglichen mit Matrizes bestehend aus chaotisch angeordneten Fasern. Ebenso fördern die parallel angeordneten Fasern eine Reifung der Kardiomyozyten (102). Diese Beobachtung zeigt, dass sich Matrizes, welche mittels dieser Methode hergestellt wurden, hervorragend für das kardiale Tissue Engineering eignen.

Betrachtet man die extrazelluläre Matrix eines dezellularisierten Herzens, so erkennt man Fasern von verschiedenen Durchmessern, welche bestimmte Aufgaben erfüllen. Matten aus parallel angeordneten Fasern mit einem Durchmesser von 300 μm bewirken, dass sich die Zellen in Clustern auf ihnen anlagern und eine runde Morphologie aufweisen. Zellen hingegen, die auf Matrizes aus parallelen Fasern mit einem Durchmesser von 1,3 μm ausgesät wurden, lagern sich in einer gestreckten Morphologie entlang der Fasern an. Das gleiche Verhalten der Zellen kann auch bei Matten aus parallelen Fasern mit einem Durchmesser von 2,8 μm beobachtet werden, wobei es bei diesem Faserdurchmesser zu einer höheren Zell-Zell-Interaktion kommt. Des Weiteren ist dieser Faserdurchmesser für eine kardiale Differenzierung geeignet (103). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass parallel ausgerichtete Fasern die Zellen dazu veranlassen sich ebenfalls parallel zueinander, entlang der Fasern anzuordnen (104, 105). Dieses Verhalten der Zellen konnte auch bei den entsprechenden Versuchen im Rahmen dieser Arbeit mit den elektrogesponnenen Matrizes beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18). Nach den Arbeiten von Hsiao et al. (106) müssen die Kardiomyozyten parallel in Reihe angeordnet sein, damit diese funktionell sind. Da die Fasern im Mikrometerbereich die Zellen nicht nur zur Elongation (103), sondern auch zu einer homogenen Verteilung anregen (102), wohingegen die Scaffolds mit Fasern im Nanometerbereich bis zu einem Mikrometer das höhere Potential für stärkere Kontraktion des Konstrukts besitzen (103), ist ein Compositescaffold (103) aus Fasern der beiden Bereiche eine vielversprechende Matrix für das kardiale Tissue Engineering. Das einzige, was bei den Matrizes mit den parallel ausgerichteten Fasern im Vergleich zu Matrizes aus chaotisch angeordneten Fasern als negativ erachtet werden kann, ist, dass die Scaffolds durch die parallelen Fasern eine höhere Steifigkeit besitzen (107).

Ein wichtiger Punkt für die Herstellung der Matrizes ist die Wahl des Polymers aus dem die Fasermatten gesponnen werden sollen. Neben natürlichen Polymeren wie Gelatine oder Kollagen kommen häufig auch synthetische Polymere zum Einsatz, da diese definiert sind und somit Scaffolds mit definierten Fasern und Eigenschaften hergestellt werden können. Solch ein künstliches Polymer ist Polycaprolacton. Es kommt bereits bei vielen Anwendungen im Bereich der regenerativen Medizin zum Einsatz. Des Weiteren hat es eine Zulassung der Food and Drug Administration (FDA), ist biologisch abbaubar (101), weich, flexibel und bildet gleichmäßige Fasern (104). Aus diesen Gründen wurde es bei diesen Versuchen eingesetzt. Jedoch weisen die Scaffolds aus Polycaprolacton einen hydrophoben Charakter auf, was zu einer verminderten Zellaffinität führt (104). Dieses Problem gibt es bei natürlichen Polymeren wie Gelatine nicht. Gelatine wird ebenfalls sehr häufig in der regenerativen Medizin eingesetzt. Sie ist biokompatibel und biologisch abbaubar. Laut der Arbeit von Kai et al. (104) verbessert ein

Compositescaffold aus Polycaprolacton und Gelatine die parallele Ausrichtung der Zellen und deren Anhaftungsverhalten im Vergleich zu einer Matrix aus reinem Polycaprolacton. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen auf den Scaffolds aus reinem PCL in einem hohen Grad parallel zueinander ausrichten. Eine sehr gute parallele Ausrichtung der Zellen konnte auch bei den Compositescaffold beobachtet werden. Aufgrund der Größe der Pulverpartikel der Herzmatrix und der damit verbundenen chaotischen Anlagerung der Zellen in diesem Bereich, können die Matrizes mit den Pulverkörnern als nicht optimale Matrix erachtet werden.

Zwischen den Compositescaffolds und den Matrizes aus reinem Polycaprolacton konnte kein Unterschied im Anwachsverhalten der Zellen festgestellt werden. Jedoch zeigte sich nach einer zweiwöchigen Kultur, dass die Zellen unterschiedliche Level an Konfluenz auf den verschiedenen Scaffolds haben. Tendenziell ließ sich beobachten, je dicker die Faser, desto höher war die Konfluenz der Zellen.

Aufgrund des Aufbaus der Elektrospinninganlage ist diese mobil und kann somit in Klimaräume verschoben und betrieben werden. Ebenso ist es möglich die Kollektorelektroden auszutauschen und je nach Anforderungsprofil andere Kollektorelektroden einzubauen, wie zum Beispiel Walzen mit einem geringen Durchmesser zum Spinnen von Scaffolds für Blutgefäße.

4.2.2 Dezellularisierte, biologische Matrix

Künstlich hergestellte Trägerstrukturen entsprechen jedoch nicht vollständig der nativen Mikroumgebung, welche die Zellen im Körper vorfinden (108). Damit diese Mikroumgebung geschaffen werden kann, wird die extrazelluläre Matrix des Körpers als Scaffold für die Zellen genutzt. Die dezellularisierte extrazelluläre Matrix bietet den Zellen eine physikalische Basis in der sie sich räumlich anlagern können (47, 109). Des Weiteren wird die extrazelluläre Matrix von den Zellen, nachdem diese in die Matrix eingewandert sind, schnell abgebaut beziehungsweise umgebaut (110, 111). Aufgrund ihrer Beschaffenheit ermöglicht die extrazelluläre Matrix den Zellen sich an ihr anzuhafte, dort zu proliferieren und sich gegebenenfalls in die entsprechende Zellart zu differenzieren (112-114). All dies macht die extrazelluläre Matrix zu einem Grundgerüst, welches für die Gewebegenerierung eingesetzt werden kann. Solche eine native Matrix wird bereits in der Regenerativen Medizin oder bei Operationen zur Rekonstruktion eingesetzt (113). Eine sehr häufig eingesetzte extrazelluläre Matrix ist die SIS. Diese wird bereits für die Rekonstruktion der Integument, der Harnblase, der Rotatorenmanschette, des Darms, der Harnröhre, des Harnleiters und des Zwerchfells herangezogen (110). Da die SIS diese Eigenschaften besitzt und auch so vielseitig einsetzbar ist, kommt sie in der vorliegenden Arbeit zum

Einsatz. Bei den verschiedenen Ansätzen in dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Zellen gut an die SIS adhären und in die Matrix einwandern.

Eine alternative Matrix ist das Herz, als natürliches Umfeld für die spezifischen Zellen. Jeder Bereich des Körpers und jedes Organ hat eine spezifische extrazelluläre Matrix (53, 115, 116), die die benötigten physikalischen Eigenschaften und biochemische Zusammensetzung (81, 116) aufweist. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Herzen oder Teile eines Herzens dezellularisiert, um ideale Matrizes für das kardiale Tissue Engineering zu generieren. Aufgrund der sehr limitierten Möglichkeiten an humanes Spendergewebe zu gelangen wurde auf Herzgewebe vom Schwein ausgewichen. In der Klinik kommen bereits Teile, wie Herzklappen vom Schwein als Implantat beim Menschen zum Einsatz. Des Weiteren haben Untersuchungen ergeben, dass die extrazelluläre Matrix, besonders Kollagen, über Spezies hinweg hoch konserviert ist (53, 117, 118). Matrizes von anderen Säugetierspezies stellen somit eine mögliche und vorhandene Quelle als Trägerstruktur für humane Zellen dar. Dabei spielt jedoch das Alter des Spendertieres eine Rolle. Jüngere Tiere weisen einen höheren Anteil an Glykosaminoglykanen auf (119), welche für den Aufbau beziehungsweise Umbau von Geweben verantwortlich sind. Daher wurden für die Dezellularisierungsversuche des Schweineherzens Schweine mit einem Alter von sechs bis acht Wochen für die Explantation des Herzens verwendet.

Die Qualität der Matrix ist auch abhängig von dem Verfahren, welches für die Dezellularisierung zur Anwendung kommt (111). Allerdings ist nicht jedes Verfahren für alle Gewebe geeignet. Somit hängt auch die Wahl des Dezellularisierungsverfahrens von den Eigenschaften und der Struktur des zu dezellularisierenden Gewebes ab (80, 113). Das bedeutet, dass die Effektivität der Dezellularisierung eines Gewebes von dem Gewebe abhängt und von der Methode, die für die Dezellularisierung zum Einsatz kommt (52).

Die häufigsten eingesetzten Verfahren bei der Dezellularisierung von Herzen sind Methoden, bei denen als Detergens entweder Natriumdodecylsulfat oder Natriumdeoxycholol eingesetzt wird. Allerdings besteht bei diesen beiden Detergenzien ein Unterschied darin in welchem Grad sie die Matrix während des Dezellularisierungsprozesses schädigen. Bei einer Dezellularisierung mit Natriumdodecylsulfat konnte eine Denaturierung des Kollagens und eine Schädigung des Basalmembrankomplexes (120) beobachtet werden. Des Weiteren wird berichtet, dass Natriumdodecylsulfat die Wachstumsfaktoren und die Ultrastruktur der Matrix schädigt (113). Ebenso ist in den Matrizes, die mit diesem Detergens behandelt wurden, ein niedrigerer Gehalt an Glykosaminoglykane nachgewiesen worden (52). Jedoch wird im Vergleich mit anderen Detergenzien bei Natriumdeoxycholol ein höherer Dezellularisierungsgrad der Matrix erreicht (52, 121) und die Mechanik der Trägerstruktur bleibt erhalten (82, 113, 122). Dem

gegenüber beinhalten Matrices, welche mit Natriumdeoxycholat dezellularisiert wurden einen höheren Gehalt an Glykosaminoglykanen. Das Dezellularisierungsverfahren mit diesem Detergens erhält zudem die elastischen Fasern der Matrix sowie die Kollagenfasern (120). Da eine Dezellularisierung mit Natriumdeoxycholat schonender für die Matrixbestandteile ist, wurde sich bei den Versuchen in dieser Arbeit für eine 1 % Natriumdeoxycholatlösung entschieden. Damit eine gleichmäßige Verteilung der Natriumdeoxycholat-Lösung im ganzen Gewebe des Schweineherzens gewährleistet werden konnte, wurde das Herz perfundiert. Diese Art der Dezellularisierung mittels Fluss kann für viele Organe angewendet werden (53) und lässt sich problemlos von Maus Herzen auf Herzen der Größe eines menschlichen Herzens und dessen Komplexität hochskalieren (82). Damit die Form und Architektur des Herzens erhalten bleibt, wurde das Herz mittels retrograder Perfusion durchspült (113). Unter Berücksichtigung all dieser Punkte konnte eine Matrix erzeugt werden, die zellfrei ist und elastische Fasern sowie Kollagenfasern enthält. Wie bei Faulk et al. (120) beschrieben, bleiben die elastischen Fasern und das Kollagen (Abbildung 10) bei der Dezellularisierung mit Natriumdeoxycholat in der Matrix erhalten, einhergehend mit gleichzeitiger Zellfreiheit.

Ein ganz wichtiger Faktor bei Transplantationen, ist die Immunantwort des Implantatempfängers. Daher sollten die dezellularisierten Matrices keine Immunantworten hervorrufen. Ineffiziente Dezellularisierung kann eine heftige Immunantwort des Implantatempfängers hervorrufen (113, 123).

Aus diesem Grund muss gewährleistet sein, dass das Verfahren der Dezellularisierung standardisiert, reproduzierbar und transparent ist. Ebenso muss eine Qualitätskontrolle der erzeugten Matrices etabliert sein. In dieser Arbeit erfolgte die Qualitätskontrolle durch H&E-Färbungen, sowie Feulgen-Färbungen. Die Schweineherzen, welche vollständig dezellularisiert waren, sind mit einem konstanten Druck von 100 mmHg dezellularisiert worden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass mit einer Perfusion von 100 mmHg gemäß dem entwickelten Protokoll eine zellfreie Herzmatrix erzeugt werden kann.

4.3 Generierung von kardialem Gewebe

Ein weiterer wichtiger Grundbaustein, welchen man neben der Matrix für die Generierung von kardialem Gewebe benötigt, sind Zellen. Da ein sehr großer Mangel an primären humanen Kardiomyozyten besteht und diese auch nicht mehr die Fähigkeit besitzen zu proliferieren, scheiden diese Zellen als mögliche Zellquelle für das Tissue Engineering aus. In der Literatur werden daher viele verschiedene Zellarten für das kardiale Tissue Engineering genannt. Die jedoch am häufigsten vorkommenden Zellarten sind iPS-Zellen oder Stammzellen, die zu Kardiomyozyten differenziert werden sowie Primärzellen, wie zum

Beispiel Kardiosphären abgeleitete Zellen. Diese Zellarten können aus dem Patienten, der ein Implantat benötigt isoliert, beziehungsweise aus isolierten Zellen generiert werden. Bei einem Implantat aus diesen Zellarten sind keine Abstoßungsreaktionen zu erwarten, da das Implantat aus körpereigenen Zellen besteht. Bei der Gewinnung von Stammzellen oder Zellen für iPS-Zellen ist kein großer invasiver Eingriff am Patienten nötig. Fibroblasten für die Reprogrammierung zu iPS-Zellen können aus einer kleinen Hautbiopsie von wenigen Millimetern, Stammzellen können aus dem Blut oder aus einer Knochenmarkbiopsie gewonnen werden. Primärzellen bedürfen eines größeren Aufwands, da eine Biopsie aus dem Zielgewebe entnommen werden muss. Je nach Gewebeart kann dies problematisch sein, zum Beispiel beim Herz beziehungsweise ist es nicht möglich eine Biopsie mit ausreichend Zellmaterial für die Isolation der verschiedenen benötigten Zellarten zu entnehmen.

4.3.1 Gewebe aus Kardiosphären abgeleiteten Zellen

Diese Zellart kann aus Biopsien des Herzens gewonnen werden und besteht aus einem heterogenen Zellmix (124-127), welcher kardiale Vorläuferzellen enthält und eine hohe Proliferationsrate besitzt (128). Entsprechend dem Protokoll von Smith et al. (30) konnten die CDCs aus dem Gewebe von humanen Herzohren isoliert werden. Diese Zellen sind laut Suzuki et al. (125) positiv für hematopoetische Marker wie cKit, mesenchymale Marker wie CD90 und CD105 sowie positiv für kardiale Marker wie GATA4, Nkx2.5, cTnT und cTnl. Zur Generierungen eines kardialen Gewebes wurden die CDCs erstmals auf die SISser ausgesät und unter verschiedenen Kulturbedingungen kultiviert. Die Kultur unter statischen Bedingungen bewirkte, dass die CDCs auf der Oberfläche der Matrix einen Multilayer bildeten (Abbildung 38A), jedoch nicht in die Matrix einwanderten. In der Literatur wird häufig beschrieben, dass eine Scherbelastung, herbeigeführt durch einen Flüssigkeitsstrom, Endothelzellen dazu animiert in eine Matrix einzuwandern (129). Solch ein Einwanderungsverhalten konnte bei der Kultivierung der CDCs unter einem konstantem (Abbildung 38B) sowie unter einem pulsativen Fluss (Abbildung 38C) mit einem physiologischen Druckverhältnis von 120/80 mmHg beobachtet werden. Die Untersuchung der CDCs, kultiviert in Zellkulturgefäßen sowie auf der biologischen Matrix SISser, auf spezifische kardiale Marker, wie sie Suzuki et al. (125) beschreibt, konnte bei den Zellpopulationen nicht nachgewiesen werden. In der heterogenen Zellpopulation der CDCs sollen sich Vorläuferzellen befinden, die in Kardiomyozyten differenziert werden können. Durch eine Behandlung mit 5-Azacidin (124, 130) oder Oxytocin (124, 131) sollen Vorläuferzellen beziehungsweise Stammzellen stimuliert werden, sich in Kardiomyozyten zu differenzieren. Nach einer Behandlung der isolierten CDCs mit 5-Azacidin beziehungsweise Oxytocin konnte keine erhöhte Expression von spezifischen kardialen Markern

nachgewiesen werden (Abbildung 39, Abbildung 40). Mögliche Gründe für dieses Ergebnis, trotz Verwendung von CDCs von 20 verschiedenen Spendern, können sein, dass in der heterogenen Zellpopulation schon sehr wenige Vorläuferzellen vorhanden waren und auch nur ein geringer Prozentsatz der Zellen sich in Kardiomyozyten differenziert hat. Somit geht die Anzahl von differenzierten Zellen in der Gesamtheit der Zellen unter und kann nicht nachgewiesen werden. Ebenso ist es möglich, dass die Umgebungsbedingungen oder die eingesetzten Konzentrationen von 5-Azacidin beziehungsweise Oxytocin zu gering waren, um die Zellen auf der SIS zu differenzieren. Da diese Zellpopulation in dieser Arbeit zum ersten Mal auf einer Matrix wie der SISser ausgesät wurden, konnte auf keine Erfahrungsberichte zurückgegriffen werden. Ein möglicher Schritt zur Generierung eines Herzmuskelgewebes mit den CDCs könnte sein, die pluripotente Zellpopulation der CDCs vor Beginn der Differenzierung spezifisch aufzureinigen, um ausschließlich die Zellen, welche differenzieren können, im Ansatz zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit kann in keinem Ansatz zur Generierung eines Herzmuskelgewebes mit CDCs gezeigt werden, dass diese Zellpopulation für den Aufbau von Herzgewebe geeignet ist.

4.3.2 Gewebe aus iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten

Die vielversprechendste Zellquelle für das kardiale Tissue Engineering bilden die iPS-Zellen. Somatische Zellen können mittels der iPS-Technologie in pluripotente Zellen umgewandelt werden (34), was dazu führt, dass diese Zellart ethisch unbedenklich ist, im Gegensatz zu humanen embryonalen Stammzellen. Ebenso können mittels dieser Technologie patientenspezifische iPS-Zellen generiert werden, was hinsichtlich der Abstoßungsreaktionen des menschlichen Körpers und der Erprobung von Therapiestrategien einen erheblichen Vorteil darstellt.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Edenhofer ist es gelungen, iPS-Zellen, welche aus humanen dermalen Fibroblasten hergestellt wurden, unter Anwendung des von Kadari et al. (132) entwickelten Protokolls in Kardiomyozyten zu differenzieren. Diese Kardiomyozyten fanden in allen Versuchen mit iPS-Zellen in dieser Arbeit Anwendung. Als Matrix für alle Versuche mit den iPS-Zellen kam die SISser zum Einsatz. Die SIS ist eine poröse Matrix, was das Zellwachstum auf der Matrix, Migration der Zellen in die Matrix und die Versorgung der eingewanderten Zellen mit Nährstoffen via Diffusion ermöglicht (133, 134). Eine der wichtigsten Eigenschaften dieser Matrix ist, dass sich die SIS sehr schnell in das Patientengewebe integriert (133, 135, 136). Ebenfalls besitzt die SIS ein Gefäßsystem, das mit Endothelzellen rebesiedelt und somit an das Gefäßsystem des Patienten angeschlossen werden kann (137). Darüber hinaus wurden auf der SIS bereits verschiedene Faktoren nachgewiesen, welche Angiogenese fördern (133, 138, 139).

Diese Eigenschaften begünstigen zum einen den Einbau der Matrix in das intakte Gewebe des Patienten und zum anderen wird durch die Bildung von Blutgefäßen die Versorgung der Zellen in dicken Konstrukten gewährleistet, da der Nährstofftransport durch Diffusion nur auf einer Distanz von etwa 100-200 µm erfolgt (138, 140). All dies zusammen, die Kombination aus iPS-Zellen und der SISser mit deren jeweiligen Eigenschaften, zeigt das Potential auf, ein adäquates kardiales Gewebe zu generieren (141).

Die Mono-Kultur der iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten auf der SISser zeigt, dass sich die Kardiomyozyten auf der Oberfläche der Matrix zu Aggregaten zusammenschließen (Abbildung 41), die zwar gleichmäßig kontrahieren, sich aber nicht nach andauernder Kulturzeit synchronisieren, was Vukadinovic-Nikolic et al. (138) auf dieser Matrix, besiedelt mit neonatalen Kardiomyozyten aus der Ratte, beobachten konnten. Bei einer genaueren Untersuchung der Cluster kann festgestellt werden, dass die Zellen in den Clustern spezifische kardiale Marker wie Troponin C, Troponin T sowie alpha Actinin exprimieren (Abbildung 42). Jedoch kann bei der lückenhaften Verteilung der Zellen auf der Oberfläche der Matrix nicht von einem funktionsfähigen kardialen Gewebe ausgegangen werden. Zur Realisierung einer Verteilung der iPS-abgeleiteten Zellen über die gesamte Fläche der SISser, wurde eine Co-Kultur der iPS-abgeleiteten Zellen mit Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Diese Zellarten wurden für die Co-Kultur ausgewählt, da ein hoher Anteil an kardialen Fibroblasten im Herzen vorkommt und die mesenchymalen Stammzellen einen positiven Einfluss auf die Bildung von kardialem Gewebe haben sollen (77, 78). Untersuchungen zeigen, dass das Herz zu einem Anteil von 30-40 % aus Kardiomyozyten besteht (142, 143). Daher wurde die Co-Kulturen mit 33 % Kardiomyozyten, 33 % kardialen Fibroblasten und 33 % mesenchymalen Stammzellen angesetzt. Die mesenchymalen Stammzellen stammen aus dem Knochenmark. Stammzellen dieser Herkunft können in Kardiomyozyten differenzieren (133, 144). Des Weiteren können mesenchymale Stammzellen Faktoren freisetzen, die wichtig für die Angiogenese (133, 145) und die Regeneration des Herzens sind (77, 78). Gemeinsam mit den kardialen Fibroblasten bewirken die Stammzellen eine gleichmäßigere Verteilung der Kardiomyozyten über die komplette Fläche der Matrix (Abbildung 43). Eine zunehmende Synchronisation der Kontraktion ist über die Dauer der Kultur des Konstrukts zu beobachten. Die Kontraktion des Scaffolds erfolgte entlang einer Achse, was die Beobachtungen von Vukadinovic-Nikolic et al. (138) bestätigt und vermuten lässt, dass sich die Zellen entlang der Fasern der SIS angelagert haben und es so zu einer gerichteten Kontraktion kommt. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnten, wie bei der Mono-Kultur, die spezifischen kardialen Marker alpha Actinin, Troponin C und Troponin T nachgewiesen

werden. Angesichts dieser Ergebnisse weist das mit der Co-Kultur aufgebaute Gewebe die größte Ähnlichkeit mit dem nativen Herzgewebe auf.

Die SISser ist in den Versuchen dieser Arbeit zum ersten Mal mit humanen iPS-Zellen besiedelt worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen auf dieser Matrix adhäreren und sich kurze Zeit nach Aussaat auf der Matrix orientiert ausrichten und ihre spontane Kontraktion wieder aufnehmen. Ebenso ist zu beobachten, dass die humanen Kardiomyozyten, welche auf der SISser kultiviert werden, eine Co-Kultur mit mindestens einer Zellart wie Fibroblasten benötigen, damit sich die iPS-Zellen über die gesamte Oberfläche der SISser verteilen, was bei neonatalen Kardiomyozyten aus der Ratte nicht notwendig ist. Des Weiteren ist es möglich die Konstrukte der Co-Kultur über den in dieser Arbeit angewandten Zeitraum zu kultivieren. In der Literatur werden meist Kulturzeiträume von 2 Wochen beschrieben. Eine Weiterführung der Kultur des Konstrukts der Co-Kultur zeigt das kontraktile Verhalten auch noch nach einer Kulturdauer von vier Monaten. Untersuchungen hinsichtlich der Expression der spezifischen kardialen Marker und der Eigenschaften des Gewebes müssen noch durchgeführt werden. Weiterhin müssen ebenfalls die elektrophysiologischen Eigenschaften der Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht und mit den Daten von nativem Herzmuskelgewebe verglichen werden, damit eine Aussage über den Reifegrad der Gewebe getroffen werden kann.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Technologien für die erfolgreiche Generierung und Kultivierung eines funktionellen Herzmuskelpatches aufgebaut. Ebenso wurden Matrizes und die Protokolle für deren Herstellung für den Einsatz im kardialen Tissue Engineering entwickelt und verglichen.

Die Dezellularisierung des porzinen Herzens konnte erfolgreich durchgeführt werden. Durch diesen Prozess konnte eine native extrazelluläre Matrix für den Einsatz im kardialen Tissue Engineering erzeugt werden. Zwar wurde mit dem Einsatz von Natriumdeoxycholat eine für das Gewebe schonende Methode entwickelt, jedoch ist die Dauer des Prozesses der Dezellularisierung mit zwei Wochen relativ lang. Zur Verkürzung der Zeit für eine vollständige Dezellularisierung des kompletten porzinen Herzens werden derzeit Versuche unter Einsatz von zusätzlichen, beziehungsweise alternativen Reagenzien, durchgeführt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Verwendung der weiteren Reagenzien keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hat. Es muss vermieden werden, dass ein höherer Anteil an wichtigen Bestandteilen der ECM als mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll aus dem Scaffold ausgelöst wird.

Mit der beschriebenen Elektrospinninganlage können standardisierte Scaffolds erzeugt werden. Dieser Prozess wurde immer unter Raumbedingungen durchgeführt. Da diese jedoch bedingt durch die Jahreszeiten variieren können, muss die Anlage hinsichtlich kontrollierbarer Umgebungsbedingungen, wie zu Beispiel Luftfeuchtigkeit und Wärme, weiterentwickelt werden, um eine gleichbleibende Qualität der erzeugten Matrizes zu gewährleisten. Eine gleichbleibende Qualität der Scaffolds ist wichtig, wenn diese beim Aufbau von Implantaten zum Einsatz kommen sollen. Bisher wurden nur Lösungen basierend auf Polycaprolacton versponnen, da es ein gut definiertes Polymer ist und somit immer das gleiche Ergebnis des Spinningprozesses zu erwarten ist. Dieses Polymer entspricht jedoch nicht den physiologischen Gegebenheiten, die in der extrazellulären Matrix des Herzens vorherrschen. Daher sollten noch weitere Polymere, die der Physiologie des Herzens eher entsprechen, versponnen werden. Ebenso sollten Versuche mit Matrizes aus biologischen Polymeren, wie zum Beispiel Kollagen Typ I oder Polymermischungen, durchgeführt werden. Des Weiteren wird in der Literatur häufig beschrieben, dass in die Matrix eingesponnene Polymere das Verhalten der Zellen positiv beeinflussen. Dieser Befund sollte ebenfalls reproduziert werden.

Der oben beschriebene Stand-Alone-Inkubator konnte erfolgreich für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings in Betrieb genommen werden. Da der Inkubator sehr groß ist und eine Parallelisierung der Versuche mit diesem Modell schwierig ist, wurde dieses System im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Form der Reaktorplattform weiterentwickelt. Für die Plattform konnte gezeigt

werden, dass sie eine funktionelle Verkleinerung des Stand-Alone-Inkubators darstellt. Jedoch kann dieses System noch weiter komprimiert werden. Daher soll in einer überarbeiteten Version die Pumpe mit dem Wärmetauscher kombiniert und die Gasaustauschereinheit sowie die Blasenfalle verkleinert werden. Eine Modifizierung der Programmierung der Steuerung sowie deren Aufbau sollte es ermöglichen, auch in diesem System einen konstanten Fluss zu realisieren. Um eine hochgradige Parallelisierung zu gewährleisten, muss ein Rack entwickelt werden, in welches die einzelnen Plattformen eingeschoben werden können und dass alle Anschlüsse für den Betrieb der Plattformen beinhaltet.

Das auf der Basis der SISser hergestellte Gewebe zeigt die Expression typischer kardialer Marker sowie eine konstante Kontraktion. Somit kann das generierte Gewebe für erste Tests von Medikamenten verwendet werden. Jedoch kann es noch nicht als Implantat genutzt werden. Damit dieses Ziel erreicht werden kann, müssen noch weitere Mischungsverhältnisse der verschiedenen Zelltypen untersucht werden. Weiterhin muss überprüft werden ob noch weitere Zelltypen wie Perizyten für eine Verbesserung der Funktionalität des Gewebes nötig sind.

Ein weiterer Faktor für die Generierung eines physiologischen Gewebes ist die Wahl der Trägerstruktur. Verschiedene elektrogessponnene Matrices sollten getestet werden, ebenso wie eine Besiedlung der dezellularisierten Herzmatrix vorgenommen werden sollte. Diese Gewebe müssen anschließend morphologisch und elektrophysiologisch untersucht werden. Für die Herstellung eines einsatzfähigen Implantates ist eine gewisse Dicke des Konstrukts notwendig. Damit die Zellen im Inneren nicht nekrotisch werden und absterben, ist eine Vaskularisierung des Gewebes erforderlich. Zur Generierung eines solchen Implantats muss überprüft werden, ob eine vaskularisierte Trägerstruktur oder eine induzierte Vaskularisierung zielführender ist.

Abschließend müssen mit den entwickelten Geweben, ungeachtet ihrer Zellzusammensetzung oder des verwendeten Scaffolds Langzeitversuche im Großtier über mehrere Monate durchgeführt werden. Anhand der durch diese Versuche generierten Ergebnisse hinsichtlich der Integration des Konstrukts in das Patientengewebe, sowie der Induzierung von Blutgerinnseln, kann die Relevanz des Konstrukts als Implantat bewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Aspekten aus den Ingenieurwissenschaften und der Biologie Systeme aufgebaut werden, welche das Tissue Engineering unterstützen und erleichtern. Insbesondere konnten mit der Unterstützung dieser Systeme Erkenntnisse zur Generierung und Reifung von kardialem Gewebe zur Verwendung als Testsystem oder Implantat gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Alrefai MT, *et al.* (2015) Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy. *Stem Cells Cloning* 8:81-101.
2. Beaglehole R & Yach D (2003) Globalisation and the prevention and control of non-communicable disease: the neglected chronic diseases of adults. *Lancet* 362(9387):903-908.
3. Reddy KS & Yusuf S (1998) Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 97(6):596-601.
4. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, & Rayner M (2014) Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European heart journal* 35(42):2929.
5. Salzberg S, *et al.* (2003) Left ventricular assist device as bridge to heart transplantation--lessons learned with the MicroMed DeBakey axial blood flow pump. *Eur J Cardiothorac Surg* 24(1):113-118.
6. Brunner-La Rocca HP, Schneider J, Kunzli A, Turina M, & Kiowski W (1998) Cardiac allograft rejection late after transplantation is a risk factor for graft coronary artery disease. *Transplantation* 65(4):538-543.
7. Murase N, *et al.* (1995) Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats. *Transplantation* 60(2):158-171.
8. Katari RS, Peloso A, & Orlando G (2014) Tissue engineering. *Adv Surg* 48:137-154.
9. Klinge R (2011) *Das Elektrokardiogramm: Leitfaden für Ausbildung und Praxis* (Thieme) 9 Ed.
10. Gekle M, *et al.* (2010) *Taschenbuch Physiologie* (Thieme) 1 Ed p 880.
11. Vacanti CA (2006) The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 10(3):569-576.
12. Guyette JP, *et al.* (2016) Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res* 118(1):56-72.
13. Klymiuk N, Aigner B, Brem G, & Wolf E (2010) Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev* 77(3):209-221.
14. Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, & Mertsching H (2004) First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 128(4):638-641.
15. Macchiarini P, *et al.* (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372(9655):2023-2030.
16. Masumoto H & Yamashita JK (2016) Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Sheets: a Platform for Cardiac Regeneration. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 18(11):65.
17. Schanz J, Pusch J, Hansmann J, & Walles H (2010) Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol* 148(1):56-63.
18. de Vries RB, *et al.* (2015) The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 9(7):771-778.
19. Bouvier d'Yvoire M, *et al.* (2012) ECVAM and new technologies for toxicity testing. *Adv Exp Med Biol* 745:154-180.
20. Ikada Y (2006) Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 3(10):589-601.
21. Hansmann J, Groeber F, Kahlig A, Kleinhans C, & Walles H (2013) Bioreactors in tissue engineering - principles, applications and commercial constraints. *Biotechnol J* 8(3):298-307.

22. Sun T, *et al.* (2005) Self-organization of skin cells in three-dimensional electrospun polystyrene scaffolds. *Tissue engineering* 11(7-8):1023-1033.
23. McCloskey KE, Gilroy ME, & Nerem RM (2005) Use of embryonic stem cell-derived endothelial cells as a cell source to generate vessel structures in vitro. *Tissue engineering* 11(3-4):497-505.
24. Trivanovic D, *et al.* (2013) Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek* 141(3-4):178-186.
25. Bony C, *et al.* (2015) Adipose Mesenchymal Stem Cells Isolated after Manual or Water-jet-Assisted Liposuction Display Similar Properties. *Front Immunol* 6:655.
26. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, & Baker HJ (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30(8):879-886.
27. Baksh D, Song L, & Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3):301-316.
28. Robinton DA & Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481(7381):295-305.
29. Chen L, *et al.* (2012) The role of notch 1 activation in cardiosphere derived cell differentiation. *Stem cells and development* 21(12):2122-2129.
30. Smith RR, *et al.* (2007) Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115(7):896-908.
31. White AJ, *et al.* (2011) Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells. *European heart journal*.
32. Messina E, *et al.* (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation research* 95(9):911-921.
33. Bayart E & Cohen-Haguenauer O (2013) Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Current gene therapy* 13(2):73-92.
34. Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
35. Takahashi K, *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.
36. Kadari A, *et al.* (2015) Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. *Stem cell reviews* 11(4):560-569.
37. Alberts B, *et al.* (2014) *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York) 6th Ed.
38. Lu P, Takai K, Weaver VM, & Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(12).
39. Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326(5957):1216-1219.
40. Hynes RO & Naba A (2012) Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(1):a004903.
41. Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(2).
42. Teo WE, He W, & Ramakrishna S (2006) Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix. *Biotechnol J* 1(9):918-929.
43. Bernard MP, *et al.* (1983) Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution. *Biochemistry* 22(22):5213-5223.

44. Bernard MP, *et al.* (1983) Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene. *Biochemistry* 22(5):1139-1145.
45. Scheller K, *et al.* (2013) Upcyte(R) microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold. *Tissue engineering. Part C, Methods* 19(1):57-67.
46. Omae H, Zhao C, Sun YL, An KN, & Amadio PC (2009) Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27(7):937-942.
47. Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, & Badylak SF (2007) Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue engineering* 13(9):2301-2310.
48. Moroni F & Mirabella T (2014) Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *Am J Stem Cells* 3(1):1-20.
49. Badylak SF, *et al.* (2005) Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *The Journal of surgical research* 128(1):87-97.
50. Gilbert TW, *et al.* (2008) Repair of the thoracic wall with an extracellular matrix scaffold in a canine model. *The Journal of surgical research* 147(1):61-67.
51. Ota T, Gilbert TW, Badylak SF, Schwartzman D, & Zenati MA (2007) Electromechanical characterization of a tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 133(4):979-985.
52. Gilbert TW, Sellaro TL, & Badylak SF (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27(19):3675-3683.
53. Guyette JP, *et al.* (2014) Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc* 9(6):1451-1468.
54. Aubin H, Kranz A, Hulsmann J, Lichtenberg A, & Akhyari P (2013) Decellularized whole heart for bioartificial heart. *Methods Mol Biol* 1036:163-178.
55. Gunatillake PA & Adhikari R (2003) Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 5:1-16; discussion 16.
56. Kim BS & Mooney DJ (1998) Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in biotechnology* 16(5):224-230.
57. He M & Callanan A (2013) Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng Part B Rev* 19(3):194-208.
58. Choi JS, *et al.* (2014) Adipose tissue: A valuable resource of biomaterials for soft tissue engineering. *Macromolecular Research* 22(9):932-947.
59. Svensson A, *et al.* (2005) Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 26(4):419-431.
60. Kim BS, Baez CE, & Atala A (2000) Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 18(1):2-9.
61. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, & Yoo JJ (2008) The influence of electrospun aligned poly(epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials* 29(19):2899-2906.
62. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, & Bianco P (1999) Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 24(6):579-589.

63. Baldock WT, Hutchens LH, Jr., McFall WT, Jr., & Simpson DM (1985) An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J Periodontol* 56(1):1-7.
64. Park JB (2011) The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16(1):e115-118.
65. Szpalski C, Wetterau M, Barr J, & Warren SM (2012) Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev* 18(4):246-257.
66. Bhardwaj N & Kundu SC (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 28(3):325-347.
67. Szentivanyi AL, Zernetsch H, Menzel H, & Glasmacher B (2011) A review of developments in electrospinning technology: new opportunities for the design of artificial tissue structures. *The International journal of artificial organs* 34(10):986-997.
68. Li D & Xia YN (2004) Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv Mater* 16(14):1151-1170.
69. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, & Koombhongse S (2000) Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 87(9):4531-4547.
70. Jacobs V, Anandjiwala RD, & Maaza M (2010) The Influence of Electrospinning Parameters on the Structural Morphology and Diameter of Electrospun Nanofibers. *J Appl Polym Sci* 115(5):3130-3136.
71. Pham QP, Sharma U, & Mikos AG (2006) Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering* 12(5):1197-1211.
72. Hodde JP, Badylak SF, Brightman AO, & Voytik-Harbin SL (1996) Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue engineering* 2(3):209-217.
73. Weymann A, et al. (2011) Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model--generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds. *Circ J* 75(4):852-860.
74. Nietzer S, et al. (2016) Mimicking Metastases Including Tumor Stroma: A New Technique to Generate a Three-Dimensional Colorectal Cancer Model Based on a Biological Decellularized Intestinal Scaffold. *Tissue engineering. Part C, Methods* 22(7):621-635.
75. Schuerlein S, et al. (2016) A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering. *Biotechnol J*.
76. Kadari A, et al. (2014) Excision of viral reprogramming cassettes by Cre protein transduction enables rapid, robust and efficient derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 5(2):47.
77. Hatzistergos KE, et al. (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 107(7):913-922.
78. Nagaya N, et al. (2005) Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112(8):1128-1135.
79. Wagner DE, et al. (2014) Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. *Biomaterials* 35(10):3281-3297.
80. Keane TJ, Swinehart IT, & Badylak SF (2015) Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* 84:25-34.
81. Wainwright JM, et al. (2010) Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue engineering. Part C, Methods* 16(3):525-532.

82. Ott HC, *et al.* (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine* 14(2):213-221.
83. Balakrishnan S, *et al.* (2015) A Scalable Perfusion Culture System with Miniature Peristaltic Pumps for Live-Cell Imaging Assays with Provision for Microfabricated Scaffolds. *Biores Open Access* 4(1):343-357.
84. Lin JL, Wu MH, Kuo CY, Lee KD, & Shen YL (2010) Application of indium tin oxide (ITO)-based microheater chip with uniform thermal distribution for perfusion cell culture outside a cell incubator. *Biomed Microdevices* 12(3):389-398.
85. Benavides Damm T, Walther I, Wuest SL, Sekler J, & Egli M (2014) Cell cultivation under different gravitational loads using a novel random positioning incubator. *Biotechnol Bioeng* 111(6):1180-1190.
86. Kurth F, Franco-Obregon A, Bartschi CA, & Dittrich PS (2015) An adaptable stage perfusion incubator for the controlled cultivation of C2C12 myoblasts. *Analyst* 140(1):127-133.
87. Studer L, *et al.* (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20(19):7377-7383.
88. Maa YF & Hsu CC (1997) Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnol Bioeng* 54(6):503-512.
89. Baskurt OK & Meiselman HJ (2003) Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29(5):435-450.
90. Smith TJN, *et al.* (2005) Advanced tissue engineering system. (Google Patents).
91. Lovett M, Rockwood D, Baryshyan A, & Kaplan DL (2010) Simple modular bioreactors for tissue engineering: a system for characterization of oxygen gradients, human mesenchymal stem cell differentiation, and prevascularization. *Tissue engineering. Part C, Methods* 16(6):1565-1573.
92. Illa X, *et al.* (2014) A novel modular bioreactor to in vitro study the hepatic sinusoid. *PLoS One* 9(11):e111864.
93. Desmoulin GT, Enns-Bray WS, Hewitt CR, & Hunter CJ (2013) Multi-unit sustained vibration loading platform for biological tissues: design, validation and experimentation. *J Biomech* 46(1):116-121.
94. Kimlin L, Kassis J, & Virador V (2013) 3D in vitro tissue models and their potential for drug screening. *Expert Opin Drug Discov* 8(12):1455-1466.
95. Berthiaume F, Maguire TJ, & Yarmush ML (2011) Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2:403-430.
96. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, & Ko FK (2002) Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 60(4):613-621.
97. Drury JL & Mooney DJ (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24(24):4337-4351.
98. Kumbar SG, James R, Nukavarapu SP, & Laurencin CT (2008) Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomedical materials* 3(3):034002.
99. Rutledge GC & Fridrikh SV (2007) Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev* 59(14):1384-1391.
100. Arts T, Costa KD, Covell JW, & McCulloch AD (2001) Relating myocardial laminar architecture to shear strain and muscle fiber orientation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5):H2222-2229.

101. Safaeijavan R, Soleimani M, Divsalar A, Eidi A, & Ardehshirylajimi A (2014) Comparison of random and aligned PCL nanofibrous electrospun scaffolds on cardiomyocyte differentiation of human adipose-derived stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 17(11):903-911.
102. Kenar H, Kose GT, Toner M, Kaplan DL, & Hasirci V (2011) A 3D aligned microfibrillar myocardial tissue construct cultured under transient perfusion. *Biomaterials* 32(23):5320-5329.
103. Fleischer S, Miller J, Hurowitz H, Shapira A, & Dvir T (2015) Effect of fiber diameter on the assembly of functional 3D cardiac patches. *Nanotechnology* 26(29):291002.
104. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, & Ramakrishna S (2011) Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 98(2):379-386.
105. Zong X, *et al.* (2005) Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 26(26):5330-5338.
106. Hsiao CW, *et al.* (2013) Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials* 34(4):1063-1072.
107. Rockwood DN, Akins RE, Jr., Parrag IC, Woodhouse KA, & Rabolt JF (2008) Culture on electrospun polyurethane scaffolds decreases atrial natriuretic peptide expression by cardiomyocytes in vitro. *Biomaterials* 29(36):4783-4791.
108. Song JJ & Ott HC (2011) Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med* 17(8):424-432.
109. Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, & Park K (1998) Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed* 9(8):863-878.
110. Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 28(25):3587-3593.
111. Badylak SF (2002) The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* 13(5):377-383.
112. Badylak SF, Taylor D, & Uygun K (2011) Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 13:27-53.
113. Crapo PM, Gilbert TW, & Badylak SF (2011) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32(12):3233-3243.
114. Vorotnikova E, *et al.* (2010) Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol* 29(8):690-700.
115. Badylak SF, Freytes DO, & Gilbert TW (2009) Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia* 5(1):1-13.
116. Wolf MT, Daly KA, Reing JE, & Badylak SF (2012) Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials* 33(10):2916-2925.
117. Lantz GC, *et al.* (1993) Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J Invest Surg* 6(3):297-310.
118. Faulk DM, Johnson SA, Zhang L, & Badylak SF (2014) Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. *J Cell Physiol* 229(8):984-989.
119. Sicari BM, *et al.* (2012) The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold. *Biomaterials* 33(22):5524-5533.
120. Faulk DM, *et al.* (2014) The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta biomaterialia* 10(1):183-193.

121. Woods T & Gratzner PF (2005) Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 26(35):7339-7349.
122. Lumpkins SB, Pierre N, & McFetridge PS (2008) A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta biomaterialia* 4(4):808-816.
123. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, & Badylak SF (2012) Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials* 33(6):1771-1781.
124. Gaetani R, *et al.* (2009) Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Cardiovasc Res* 82(3):411-420.
125. Suzuki G, *et al.* (2014) Global intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells improves ventricular function and stimulates endogenous myocyte regeneration throughout the heart in swine with hibernating myocardium. *PLoS One* 9(11):e113009.
126. Gago-Lopez N, *et al.* (2014) THY-1 receptor expression differentiates cardiosphere-derived cells with divergent cardiogenic differentiation potential. *Stem Cell Reports* 2(5):576-591.
127. Masuda S, Montserrat N, Okamura D, Suzuki K, & Izpisua Belmonte JC (2012) Cardiosphere-derived cells for heart regeneration. *Lancet* 379(9835):2425-2426; author reply 2426-2427.
128. Li Z, Guo X, Matsushita S, & Guan J (2011) Differentiation of cardiosphere-derived cells into a mature cardiac lineage using biodegradable poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Biomaterials* 32(12):3220-3232.
129. Urbich C, *et al.* (2002) Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1):69-75.
130. Oh H, *et al.* (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12313-12318.
131. Oyama T, *et al.* (2007) Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 176(3):329-341.
132. Kadari A, *et al.* (2014) Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. *Stem cell reviews*.
133. Tan MY, *et al.* (2009) Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits. *Biomaterials* 30(19):3234-3240.
134. Badylak S, Liang A, Record R, Tullius R, & Hodde J (1999) Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials* 20(23-24):2257-2263.
135. Witt RG, Raff G, Van Gundy J, Rodgers-Ohlau M, & Si MS (2013) Short-term experience of porcine small intestinal submucosa patches in paediatric cardiovascular surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 44(1):72-76.
136. Robotin-Johnson MC, Swanson PE, Johnson DC, Schuessler RB, & Cox JL (1998) An experimental model of small intestinal submucosa as a growing vascular graft. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 116(5):805-811.
137. Mertsching H, *et al.* (2009) Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation* 88(2):203-210.
138. Vukadinovic-Nikolic Z, *et al.* (2014) Generation of bioartificial heart tissue by combining a three-dimensional gel-based cardiac construct with decellularized small intestinal submucosa. *Tissue Eng Part A* 20(3-4):799-809.

139. Hoganson DM, *et al.* (2010) Preserved extracellular matrix components and retained biological activity in decellularized porcine mesothelium. *Biomaterials* 31(27):6934-6940.
140. Eschenhagen T & Zimmermann WH (2005) Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97(12):1220-1231.
141. Andree B, *et al.* (2014) Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue. *Basic Res Cardiol* 109(6):441.
142. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, & Eulderink F (1991) Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *European heart journal* 12(4):488-494.
143. Camelliti P, Borg TK, & Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65(1):40-51.
144. Makino S, *et al.* (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103(5):697-705.
145. Tang YL, *et al.* (2005) Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of thoracic surgery* 80(1):229-236; discussion 236-227.

Anhang

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Azellularisierung der SIS-ser</p> <p>Matrixherstellung</p>
---	--

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Atemschutzmaske
- mind. 2 Bechergläser 500 ml
- Plastikwanne
- 50 ml Einwegspritze
- 10 ml Einwegspritze
- Becher
- Gesichtsschutz
- Nitrilhandschuhe
- Pinzetten und Schere
- Pipetten
- Schutzbrille
- Transportbehälter zum Bestrahlen: Styroporkiste mit eiskalten Kühlakkus
- Venenklemmen

2. Geräte

- Pipettierhilfe
- Sterilberkbank
- Wippschüttler

3. Lösungen

- ca.2-4 l AZ-Lösung (34 g Deoxycholic Acid Sodium (Sigma, D6750-25G) in 1 l Reinstwasser)
- **Unter dem Abzug ansetzen, Atemschutz und Gesichtsschutz tragen!!!**
- PBS⁻-Puffer (PBS-Pulver, BioChrom AG, L182-50) insteril
- steriler PBS⁺-Puffer

4. Durchführung

Die Azellularisierung muss dokumentiert werden. Für jede Matrix muss ein Verlaufsprotokoll geführt werden. Jede Präparation bekommt eine fortlaufende Chargennummer (M1.1 → 1 für Präparation und .1 → für die individuelle Nummerierung der Matrix. Die Proben für den Gallsäuretest werden bei 4°C im Kühlraum neben dem Schüttler gelagert Sabine Graiff holt sich die Proben am darauf folgenden Montag Die Vorlage liegt in Q → Labor → Arbeitsanweisungen → Zellkultur → Matrixherstellung. Nach Ende der Azellularisierung muss das Verlaufsprotokoll an Sabine Graiff abgegeben werden.

Tag 1:

- PBS⁻-Puffer zum Spülen ansetzen (Lagerung bei 4 °C)
- Gefäßbaum muss vollständig abgeschnitten sein. Darm in ca. 50 cm lange Stücke schneiden.
- Darmstücke unter fließendem Leitungswasser gründlich spülen, um Faecesreste und Bakterien zu entfernen
- Darmsegmente in 10 cm lange Stücke schneiden. Darauf achten, dass keine Peyerschen Plaques („weiße Stellen“) an den Stücken liegen.
- Darm ‚auf links‘ drehen (Innenseite nach außen), hierfür Darm auf große Pinzette mit abgerundeten Enden ziehen, vorderes Ende mit der Pinzette greifen und Darm umstülpen
- Darm auf 15ml Falcon ziehen, mit dem Griffende einer Pinzette die Mucosa vorsichtig abschaben (über einer Wanne arbeiten, um Abfall aufzufangen)
- Darmstücke in PBS⁻ + 1% Pen/Strep üN auf Wippschüttler bei 4°C lagern

Erstellt von: Moll und Graiff

Gültig ab: 16.01.2014

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Azellularisierung der SIS-ser</p> <p>Matrixherstellung</p>
--	--

Seite 2 von 2

Tag 2:

- AZ-Lösung ansetzen
- 1ml der angesetzten AZ-Lösung für den Gallsäuretest abnehmen
- Darmstück am einen Ende zu klemmen, mittels Spritze mit AZ-Lösung befüllen, anderes Ende zuklemmen, in einen Becher mit AZ-Lösung legen
- 1 - 1,5 Std. auf Wippschüttler im Kühlraum inkubieren
- danach die ‚Darmwurst‘ an einem Ende öffnen, AZ-Lösung ausleeren.
- 1 ml AZ-Lösung aus dem Lumen entnehmen für **Gallsäuretest**.
- Darmstücke ausdrücken, um auf-/abgelöste Gewebereste zu entfernen
- mit PBS-Puffer spülen, die ‚Darmwurst‘ mit **PBS ohne Antibiotika** füllen, im Kühlraum 1 Std. auf dem Wippschüttler inkubieren.
- 1ml Spülpuffer entnehmen für **Gallsäuretest**
- für weitere Spülschritte Darm an beiden Enden abschneiden an denen die Klemmen waren
- 4 - 5 x in frisches PBS mit Antibiotika umsetzen. Inkubation jeweils für 1 Stunde
- bis zur Gammasterilisation **2 - 3 mal täglich PBS mit Antibiotika** austauschen
- Am Tag der Sterilisation Darmstücke in PBS ohne Antibiotika umsetzen für Gamma-Sterilisation (wird meist von TA übernommen, bitte absprechen).
- Kunststoffbehälter gut verschließen, in die vorbereitete Transporttasche mit Kühlakkus („umfallsicher“) stellen, Lieferung zur Gamma-Sterilisation (wird von Sabine Graiff organisiert)

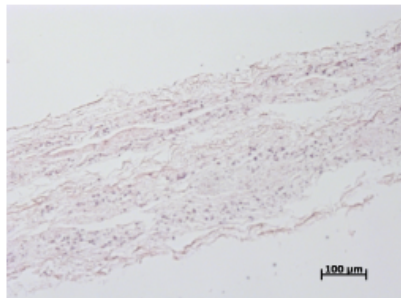


Abbildung 1: HE-Färbung der SIS-ser (ohne muc)

5. Bemerkungen

- **Stücke mit Peyerschen Plaques** = zusammenhängende Ansammlungen von 10 bis 50 Lymphknötchen (**weiße Stellen**) oder **Löchern werden verworfen**.
- Die Sterilisierung wird durch Bestrahlung mit 25 kgray üN bei Firma BBF Sterilisationservice GmbH, Rommelshausen durchgeführt.
- Die Anlieferung/Abholung sollte so organisiert werden, dass die Bestrahlung möglichst bald durchgeführt wird.
- Bis zur Bestrahlung sollte der Darm mind. eine Nacht, max. 1 Woche in der oben beschriebenen Weise gespült werden.

Erstellt von: Moll und Graiff

Gültig ab: 16.01.2014

1. Materialien

- 50 ml-Zentrifugenröhrchen
- Petrischalen ø 10 cm
- Petrischalen ø 10 cm, beschichtet mit 0,1% Gelatine und Fibronectin
- Petrischalen ø 10 cm, beschichtet mit Poly-D-Lysin (BD; Bestellnr.: 356469)
- 6 Well-Platte, beschichtet mit Poly-D-Lysin (BD, Bestellnr.: 354469)
- Skalpellhalter mit sterilen Klingen
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Pinzetten
- sterile Einmalpipetten
- sterile Pipettenspitzen 1000 µl

2. Geräte

- Absaugeinrichtung
- Brutschrank (37 °C, 5% CO₂)
- Mikroskop
- Pipetten
- Pipettierhilfe
- Sicherheitswerkbank
- Vortex
- Wasserbad
- Zentrifuge

3. Chemikalien und Lösungen

- B27 (Invitrogen, Bestellnr.: 17504-044)
- bFGF (PEPROTECH, Bestellnr.: 100-18B)
- Cardiotrophin1 (PEPROTECH, Bestellnr.: 300-32)
- Collagenase A, Stock 1mg/ml (Roche, Bestellnr.: 10103578001)
- DMEM/Ham's F12 (Invitrogen, Bestellnr.: 31331-028)
- DMSO
- EGF (Sigma-Aldrich, Bestellnr.: E4127)
- FCS
- Fibronectin Stock 10µg/ml
- Gelatine
- Glutamin
- IMDM (Invitrogen, Bestellnr.: 31980-022)
- Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Bestellnr.: M7522)
- PBS
- Thrombin (Sigma-Aldrich, Bestellnr.: T4393)
- Trypsin (Invitrogen, Bestellnr.: 25090-028)
- Trypsin/EDTA 1%
- Versen (Invitrogen, Bestellnr.: 15040-033)

Medium für Explantate und CDCs (insgesamt 550 ml):

- IMDM 500 ml
- FCS10%
- Mercaptoethanol 3,79 µl

Medium für Cardiospheren (insgesamt 100ml):

- DMEM/Ham's F12 65 ml
- IMDM 35 ml
- FCS 3,5 ml
- Glutamin 1 ml
- B27 2 ml
- Mercaptoethanol 0,69 µl
- EGF 25 ng/ml
- Cardiotrophin1 4 ng/ml
- bFGF 40 ng/ml
- Thrombin 1 U/ml

Gelatinelösung zum Beschichten einer Petrischale ø 10cm (insgesamt 4,04ml):

- 0,1%ige Gelatine-Lösung 4 ml
- Fibronectin 40 µl

Gelatinelösung zum Beschichten eines Wells einer 6 Well-Platte (insgesamt 1,01ml):

- 0,1%ige Gelatine-Lösung 1 ml
- Fibronectin 10 µl

Trypsin-Lösung für Gewebeerddau (insgesamt 25ml):

- 2,5%iges Trypsin 2 ml
- PBS 23 ml

Trypsin-Lösung zum Ernten der ausgewachsenen Zellen (insgesamt 50ml):

- 2,5%iges Trypsin 1 ml
- Versen 49 ml

Einfriermedium für Cardiospheren (insgesamt 1ml):

- Medium für Explantate und CDCs 425 µl
- DMEM/Ham's F12 425 µl
- B27 50 µl
- DMSO 100 µl

4. Durchführung**Beschichten von Petrischalen mit Gelatine und Fibronectin:**

- genügend Gelatine-Lösung wie oben beschrieben ansetzen
- Gelatine-Lösung in Petrischale pipettieren und gleichmäßig verteilen
- Petrischalen mit Gelatine-Lösung für mindestens **20 min** im Brutschrank bei **37 °C** inkubieren
- danach Petrischalen in Parafilm einwickeln und bis zum Gebrauch bei 4 °C lagern

Aufarbeitung Herzohr-Gewebe:

- Herzohr in eine Petrischale mit 5ml Medium für Explantate und CDCs geben
- Fettgewebe mit Skalpell entfernen
- Herzohr in kleine Stücke schneiden (ca. 1 mm³)
- Gewebestücke im Zentrifugenröhrchen überführen und 4x mit PBS spülen
- Gewebestücke abzentrifugieren (5 min, 1200 rpm)
- Überstand absaugen
- Gewebestücke mit **2 ml** Trypsin-Lsg. für Gewebeerddau + **400 µl** Collagenase A für 15min (nach jeweils 5 min kurz vortexen) verdauen
- Abstoppen des Verdaus mit 5ml Medium für Explantate und CDCs
- Gewebestücke abzentrifugieren und Überstand absaugen
- Gewebestücke in frischem Medium für Explantate und CDCs resuspendieren
- Gewebestücke in Gelatine-beschichtete Petrischalen ausplattieren (je nach Menge der Gewebestücke eine geeignete Anzahl an Platte verwenden!)

- jede Petrischale mit insgesamt 5 ml Medium für Explantate und CDCs befüllen und in Brutschrank stellen
- Petrischalen mit Gewebestücken 4-5 Tage ruhen lassen → **kein Medienwechsel!**
- nach 4-5 Tagen Medium vorsichtig absaugen und durch frisches Medium für Explantate und CDCs ersetzen
- Zellen beginnen nach ca. 2-6 Tagen aus Gewebestücken auszuwachsen
- Petrischalen bis zu 80-90 % Konfluenz bewachsen lassen, dann ausgewachsene Zellen Ernten (siehe nächster Abschnitt)
- im Medium schwimmende Gewebestücke können 7 Tage nach Beginn der Aufarbeitung nochmals verdaut und ausplattiert werden

Ernten der ausgewachsenen Zellen:

- Medium aus Petrischalen absaugen und Schalen 2x mit PBS⁻ spülen
- 5ml 5%ige Trypsin-Lösung zum Ernten der ausgewachsenen Zellen in Petrischale pipettieren, nach 5 minütiger Inkubation im Brutschrank das Ablösen der Zellen mit dem Mikroskop überprüfen, gegebenenfalls noch etwas Trypsin zugeben
- Reaktion mit 1-2 ml FCS abstoppen
- abgelöste Zellen mit Einmalpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführen, dabei darauf achten, dass keine Gewebestücke mit transferiert werden! (aus diesen wachsen noch weitere Zellen aus)
- Petrischalen wieder mit jeweils 5ml Medium für Explantate und CDCs befüllen
- Zellen abzentrifugieren (5 min, 1200 rpm)
- Zellen in **Medium für Cardiosphären** resuspendieren und Zellzahl bestimmen
- Zellen folgendermaßen in Poly-D-Lysin beschichteten Kulturgefäßen mit Medium für Cardiosphären aussäen:
 - o 2-4x10⁵ Zellen in ein Well einer 6 Well-Platte
 - o 1-2x10⁶ Zellen in eine Petrischale ø 10cm

Ernten von Cardiosphären


- nach 2-3 Tage schwimmen Cardiosphären im Medium
- Medium mit den Cardiosphären mit einer Einmalpipette abnehmen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- Petrischalen wieder mit 5ml Medium für Cardiosphären befüllen
- Cardiosphären abzentrifugieren und Überstand absaugen
- Cardiosphären mit Medium für Explantate und CDCs resuspendieren
- Cardiosphären je nach Anzahl in Gelatine-beschichtete Petrischalen oder 6 Well-Platten (die gleichen wie bei der Aufarbeitung von Herzohr-Gewebe) mit ausreichend Medium für Explantate und CDCs (Petrischale 5ml, Well 2-3 ml) aussäen
- die Cardiosphären lagern sich am Boden an und die CDCs wachsen aus

Ernten von CDCs:

- Medium aus den Petrischalen absaugen
- Petrischalen mit PBS⁻ spülen
- CDCs mit 1 % Trypsin/EDTA ablösen, ca. 5 min im Brutschrank inkubieren (bis alle Zellen abgelöst sind)
- Reaktion mit 1 ml FCS abstoppen

6. Bemerkungen

- Cardiosphären können alle 2-3 Tage (bei jedem Medienwechsel) geerntet werden

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Isolation und Kultivierung humaner mesenchymaler Vorläuferzellen (hMSC) aus Spongiosa</p> <p>Gewebespezifische Zellkultur: Knochenmark</p>
---	--

Seite 1 von 1

1. Materialien

- sterile Pasteurpipetten
- sterile Glaspipetten
- T150 Zellkulturflaschen
- 50ml-Zentrifugenröhrchen
- sterile Pinzette
- 10ml-Einmalpipetten
- Zellzählkammer

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad (37°C)
- Zentrifuge
- Mikroskop

3. Lösungen

- MSC-Kulturmedium:
MSCGM-CD (LONZA, 00190632) + 2% FCS + 1% Antibiotikum
- 1x Lysis Puffer (NEB, 9803)
- PBS⁺
- Trypanblau (0,4%)

4. DurchführungIsolation:

- Spongiosa in 50ml-Zentrifugenröhrchen mit steriler Pinzette überführen (max. halb füllen)
- vorgewärmtes PBS⁺ zugeben (ca. 20ml pro Durchgang zugeben)
- kräftig schütteln, um die Zellen aus der Spongiosa herauszuwaschen
- Überstand mit Einmalpipette aufnehmen und in ein neues Röhrchen überführen
- so lange wiederholen, bis die Spongiosa fast weiß ist
- gesammelte Zellsuspension für 5 min bei 300 xg zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Zellen in ausreichend Medium gut resuspendieren (ca. 25 ml)
- Probe zum Zählen entnehmen (50 µl) und mit 1x Lysis Puffer 1:1 mischen
- Anschließend das Zell-Lysis Puffer Gemisch 1:1 mit Trypanblau mischen (→ Endkonzentration 1:4)
- Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchführen
- 5 x 10⁵ Zellen/T150-Zellkulturflasche aussäen

Kultivierung:

- nach ca. 3-4 Tagen Überstand (mit Blutzellen) entfernen, adhärenente Zellen mit PBS⁺ waschen
- Zugabe von 20 ml Kulturmedium
- Medienwechsel 2x pro Woche

5. Bemerkungen

- Alter und Geschlecht des Spenders sowie Tag der Aufarbeitung und Name des Durchführenden in der Biopsatentabelle (unter Q:\Labor\Biopsatentabelle) vermerken

Bei einer „guten“ MSC-Kultur ist die Konfluenz der Primärkultur nach ca. 10-14 Tagen zu erwarten.

weitere Kultivierung:

Bei einer Aussaat von 4x10⁵ Zellen pro T150-Zellkulturflasche in den weiteren Passagen ist nach ca. 7 Tagen mit Konfluenz zu rechnen. Bis Passage 5 verwendbar.

Erstellt von: Reboredo

Gültig ab: 08.08.2013

Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin		Isolation und Kultivierung dermaler Fibroblasten (dF) Gewebespezifische Zellkultur: Haut
---	---	---

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Skalpellhalter mit sterilen Skalpellklingen
- Petrischalen
- sterile Pinzetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellsieb 100µm
- 50ml-Zentrifugenröhrchen
- Zellkulturflaschen
- sterile Einmalpipetten

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad 37°C
- Zentrifuge
- Mikroskop

3. Lösungen

- Transportlösung für Biopsat: PBS⁺ mit 1 % Antibiotikum (PenStrep)
- Dispase-Lösung (2,0 U/ml)
- PBS⁻ (Sigma; #D8537-6x500ml)
- Kollagenase-Lösung (500 U/ml)
- Kulturmedium: DMEM (Lonza; #BE12-614F) + 10 % FCS
- PenStrep

4. Durchführung

- Tag 1: Vorbereitung der Zellisolation
 - o Als Sterilkontrolle 3 ml Transportmedium in T25-Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank ü.N. inkubieren
 - o Biopsat in sterile Petrischale überführen und 3x mit PBS⁻-Lösung spülen (Gewebestücke dabei nicht austrocknen lassen)
 - o Mit Skalpell sorgfältig Fett- und Bindegewebe entfernen; ggf. Haare entfernen
 - o Biopsat 3x mit PBS⁻-Lösung spülen
 - o Oberfläche des Biopsats bestimmen (für Bedarf Trypsin/EDTA-Lösung am Folgetag)
 - o Biopsat mit Skalpell in ca. 2 - 3 mm breite, gleichmäßige Streifen schneiden
 - o Biopsatstreifen in Petrischale überführen und 3x mit PBS⁻-Lösung spülen
 - o Biopsatstreifen vollständig mit Dispase-Lösung bedecken (5-10 ml auf 6 cm²) und bei 4 °C ü.N. für 16 bis 18 h inkubieren
- Tag 2: Isolation der Fibroblasten
 - o Sterilkontrolle auf mögliche Kontamination überprüfen, Ergebnis notieren.
HINWEIS: Bei Kontamination Waschschrte vor Medienwechseln während der Kultivierung durchführen. Beim Übergang in Antibiotikum-freies Medium muss Kontamination beseitigt sein, andernfalls Aufarbeitung verwerfen
 - o Vorbereitend 2 Petrischalen mit PBS⁻-Lösung bereitstellen und Trypsin im Wasserbad vorwärmen
 - o Dispase-Lösung aus der ü.N. inkubierten Petrischale absaugen und 10 ml PBS⁻-Lösung zugeben
 - o Mit Pinzette dermale Schicht der Hautstreifen festhalten, mit der zweiten Pinzette die Epidermis abziehen. Beide Schichten in vorbereitete Petrischalen überführen

Erstellt von: Kurdyn

Gültig ab: 01.03.2013

Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin		Isolation und Kultivierung dermaler Fibroblasten (dF) Gewebespezifische Zellkultur: Haut
---	---	---

Seite 2 von 2

- HINWEIS: Epidermis ggf. weiter zur Gewinnung dermaler Keratinozyten verwenden, andernfalls verwerfen
- HINWEIS: Ggf. zunächst Isolation dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen durchführen, Dermisstücke anschließend in Petrischale mit PBS-Lösung überführen
- Dermisstücke mit einem Skalpell in ca. 3x3 mm große Stücke zerschneiden
- 5 ml Kollagenase-Lösung in 50ml-Zentrifugenröhrchen vorlegen und Dermisstücke mit Skalpell überführen. Petrischale mit weiteren 5 ml Kollagenase-Lösung spülen. Suspension anschließend ebenfalls in Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugenröhrchen für 45 min bei 37 °C inkubieren
- Nach Zentrifugation (5 min bei 1200 rpm) Überstand abnehmen und Pellet in ca. 10 ml Kulturmedium resuspendieren
- Suspension 5 min bei 1200 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Pellet mit 5ml-Einmalpipette in 2 ml Kulturmedium resuspendieren und in T75-Zellkulturflasche überführen
- Kultivierung
 - Am Folgetag 6 ml Kulturmedium zugeben.
 HINWEIS: Während der ersten Woche dürfen die Stücke nicht aufschwimmen damit die Fibroblasten aus dem Gewebe auswachsen können. Aus diesem Grund die Menge des zugegebenen Kulturmediums gering halten und Erschütterungen während des Transports vermeiden.
 - Nach 5 Tagen Dermisstücke mit PBS⁻ aus den Zellkulturflaschen herausspülen, Kulturmedium zugeben
 - Ab Passage 1 auf Antibiotika-freies Kulturmedium wechseln

5. Bemerkungen

- Fibroblasten bei 80 - 90 % Konfluenz passagieren
- Fibroblasten können bis max. Passage 6 verwendet werden (auf Änderung der Zellmorphologie/-größe und Verlangsamung des Wachstums achten)
- Biopsate können für die Fibroblastenisolation bis zu 4 Tage nach OP verwendet werden. Die Lagerung des Biopsats erfolgt bei 4°C
- Gewebesuspensionen ausschließlich mit Plastikpipetten resuspendieren
- Alle Spenderdaten (Alter, Geschlecht) sowie die ermittelten Zellzahlen in die Biopsatentabelle eintragen

<p>Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p> 	<p>Isolation und Kultivierung dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (dmvECs) Gewebespezifische Zellkultur: Haut</p>
---	--

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Skalpellhalter mit sterilen Skalpellklingen
- Petrischalen
- sterile Pinzetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellsieb 100 µm
- 50ml-Zentrifugenröhrchen
- Zellkulturflaschen
- sterile Einmalpipetten

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad 37°C
- Zentrifuge
- Mikroskop
- Neubauer-Kammer, ggf. Zellzählgerät

3. Lösungen

- Transportlösung für Biopsat: PBS⁺ mit 1 % Antibiotikum (PenStrep)
- Dispase-Lösung (2,0 U/ml)
- PBS⁻ (Sigma; #D8537-6x500ml)
- Versene (life technologies; #15040033)
- 0,05% Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung
- FCS
- Kulturmedium: Vasculife (VEGF-Mv Cell Culture Medium Kit; CellSystems; #LL-0005)
- PenStrep

4. Durchführung

- Tag 1: Vorbereitung der Zellisolation
 - o Als Sterilkontrolle 3 ml Transportmedium in T25-Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank ü.N. inkubieren
 - o Biopsat in sterile Petrischale überführen und 3x mit PBS⁻-Lösung spülen (Gewebestücke dabei nicht austrocknen lassen)
 - o Mit Skalpell sorgfältig Fett- und Bindegewebe entfernen; ggf. Haare entfernen
 - o Biopsat 3x mit PBS⁻-Lösung spülen
 - o Oberfläche des Biopsats bestimmen (für Bedarf Trypsin/EDTA-Lösung am Folgetag)
 - o Biopsat mit Skalpell in ca. 2 - 3 mm breite, gleichmäßige Streifen schneiden
 - o Biopsatstreifen in Petrischale überführen und 3x mit PBS⁻-Lösung spülen
 - o Biopsatstreifen vollständig mit Dispase-Lösung bedecken (5-10 ml auf 6 cm²) und bei 4 °C ü.N. für 16 bis 18 h inkubieren
- Tag 2: Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen (mcECs)
 - o Sterilkontrolle auf mögliche Kontamination überprüfen, Ergebnis notieren.

Erstellt von: Kurdyn

Gültig ab: 01.03.2013

<p>Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p> 	<p>Isolation und Kultivierung dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (dmvECs) Gewebespezifische Zellkultur: Haut</p>
---	---

Seite 2 von 2

- HINWEIS: Bei Kontamination Waschschriffe vor Medienwechseln während der Kultivierung durchführen. Beim Übergang in Antibiotikum-freies Medium muss Kontamination beseitigt sein, andernfalls Aufarbeitung verwerfen
- Vorbereitend 2 Petrischalen mit PBS⁻-Lösung bereitstellen und Trypsin im Wasserbad vorwärmen
 - Dispase-Lösung aus der ü.N. inkubierten Petrischale absaugen und 10 ml PBS⁻-Lösung zugeben
 - Mit Pinzette dermale Schicht der Hautstreifen festhalten, mit der zweiten Pinzette die Epidermis abziehen. Beide Schichten in vorbereitete Petrischalen überführen
HINWEIS: Epidermis ggf. weiter zur Gewinnung dermaler Keratinozyten verwenden, andernfalls verwerfen
 - Dermisstücke mit 10 ml Versene / 6 cm² spülen, Lösung anschließend absaugen
 - Je 6cm² Biopsatoberfläche 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu Dermisstückchen zugeben, für 40 min im Brutschrank inkubieren
 - Die Enzymreaktion mit 1 % FCS abstoppen, Dermisstückchen in Petrischale mit vorgewärmten VascuLife überführen
 - Jedes Dermisstückchen mit dem Skalpell unter leichten Druck 8x von allen Seiten ausstreichen
HINWEIS: Die Dermisstückchen können anschließend zur Isolation dermaler Fibroblasten verwendet werden, andernfalls verwerfen
 - Die Zellsuspension über Zellsieb in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführen
 - Petrischale und Zellsieb 3x mit 5 ml VascuLife nachspülen
 - Zellsuspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
 - Pellet in 1 - 2 ml VascuLife resuspendieren
 - Zellzählung mit Neubauer-Kammer
 - Zellen in Zellkulturschalen aussäen
 - Aussaatdichte für mvEC aus Präputium: 1,2x10⁴ vitale Zellen pro cm² (T25-Flasche: 3x10⁵ Zellen in 3 ml Medium)
 - Aussaatdichte für mvEC aus adulter Haut: 4-5x10⁴ vitale Zellen pro cm² (T25-Flasche: 1x10⁶ Zellen in 8ml Medium)
- Kultivierung
- Alle 3 - 4 Tage einen Mediumwechsel durchführen
 - Ggf. überwuchernde Fibroblasten aus den Kulturen entfernen: Dazu VascuLife abnehmen und Versene zugeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 – 15 min (starke Spendervarianz!) kann ein Abkugeln der Fibroblasten und anschließend deren Ablösen beobachtet werden.
HINWEIS: mvECs lösen sich bei zu langer Inkubationszeit ebenfalls ab. Aus diesem Grund den Verlauf des Abkugeln im Mikroskop beobachten und rechtzeitig beenden
 - Versene abnehmen und Zellkulturschale mit 5 - 10ml PBS⁻ waschen, Kulturmedium zugeben
 - Ab Passage 1 auf Antibiotika-freies Kulturmedium wechseln

5. Bemerkungen

- Für Versuche ausschließlich mvEC-Kulturen verwenden, deren Fibroblastenanteil < 10 %
- mvECs können bis Passage 3 für Versuche eingesetzt werden
- Aussaatdichte bei Subkultivierung beträgt 5 x 10⁴ Zellen / cm²
- Biopsate können für die Endothelzellisolation bis zu 2 Tage nach OP verwendet werden. Die Lagerung des Biopsats erfolgt bei 4°C
- Gewebesuspensionen ausschließlich mit Plastikpipetten resuspendieren
- Alle Spenderdaten (Alter, Geschlecht) sowie die ermittelten Zellzahlen in die Biopsatentabelle eintragen.
- Alternativ zu VascuLife können mvECs auch in ECGM kultiviert werden

Erstellt von: Kurdyn

Gültig ab: 01.03.2013

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Passagieren von Zellen mit Trypsin</p> <p>Zellkultur: Grundlagen</p>
--	--

Seite 1 von 2

1. Materialien

- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellkulturflaschen
- Zentrifugenröhrchen
- Zellählkammer

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Wasserbad (37°C)
- Pipettierhilfe
- Absaugeinrichtung
- Zentrifuge
- Zellählgerät
- Mikroskop

3. Lösungen

- Waschpuffer: PBS/EDTA-Lösung
- Ablösepuffer: Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (0,05 % in PBS/EDTA)
- zellspezifisches Kulturmedium ggf. mit Supplementen, Antibiotikum
- FCS
- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung**Generell gilt:**

Alle Zellen, die sich leicht von der Kulturoberfläche ablösen lassen (z.B. viele Zelllinien, Fibroblasten), können ohne vorherige Inkubation in PBS/EDTA-Lösung direkt mit Trypsin abgelöst werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die **Einwirkzeit des Enzyms möglichst 5 Minuten nicht überschreitet**, da dann eine Zellschädigung nicht mehr ausgeschlossen werden kann!.

Schwer abzulösende Zellen, wie z.B. Keratinozyten, **müssen mit PBS/EDTA-Lösung mindestens 1x 10 min vorinkubiert werden**. Dabei ist der Ablösevorgang der Zellen immer wieder unter dem Mikroskop zu beobachten. Diese Zellen müssen vor Zugabe des Trypsins schon teilweise abgekugelt sein, wenn nicht, ist die Inkubation in PBS/EDTA-Lösung zu wiederholen.

- mikroskopische Kontrolle der Zellkultur nach typischen Kriterien (z.B. Morphologie, Zelldichte, Kontaminationen)
- benötigte Wasch- und Ablöse-Puffer sowie Medium im Wasserbad temperieren (37°C)
- neue Zellkulturflasche(n) beschriften: Zellart, Passagenzahl, Datum, Namenskürzel
- Werkbank vorbereiten inklusive Desinfektion mit Descosept AF
- Wasch- und Ablöse-Puffer aus dem Wasserbad nehmen und Gefäße desinfizieren
- Medium absaugen, Waschpuffer zugeben (T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml), spülen und absaugen
- optional: Waschpuffer zugeben (T25: 2 ml, T75: 5 ml, T150: 9 ml) und im Brutschrank für 10 min inkubieren
- Vorgang ggf. wiederholen (wenn Zellen noch nicht abgekugelt)
- Ablösepuffer zugeben (T25: 2 ml, T75: 5 ml, T150: 9 ml), max. 3-5 min im Brutschrank inkubieren, Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren, ggf. durch vorsichtiges Klopfen unterstützen
- FCS aus Wasserbad entnehmen, Gefäß desinfizieren und in die Werkbank stellen, nach dem Öffnen Deckel mit Öffnung nach unten ablegen

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Passagieren von Zellen mit Trypsin</p> <p>Zellkultur: Grundlagen</p>
---	---

Seite 2 von 2

- Enzymreaktion durch Zugabe von >10%FCS stoppen (FCS nach dem Auftauen bei 1200rpm 5min zentrifugieren und Pellet verwerfen)
- Zellen durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren, in Zentrifugenröhrchen überführen
- Zellkulturflasche jetzt noch einmal mit PBS/EDTA spülen (T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml) und in das Zentrifugenröhrchen überführen
- Zellsuspension zentrifugieren: 1200 rpm, 5 min
- Überstand vorsichtig absaugen, Pellet in geeignetem Volumen (abhängig von Zelldichte) Medium resuspendieren
- davon Aliquot (mind. 10 µl, max. 50 µl) zur Zellzählung abnehmen und ggf. mit Trypanblau 1:1 mischen
- Zellzählung durchführen (durchschnittliche Zellzahl pro Quadrant x 2 (aufgrund Trypanverdünnung) x 10 000 = Zellzahl/ml)
- Medium in neuen Zellkulturflaschen vorlegen
- Zellen in gewünschter Konzentration in neue Zellkulturflaschen aussäen (Gesamtvolumina: T25: 2-3 ml, T75: 6-9 ml, T150: 18-20 ml) und nochmals resuspendieren

5. Bemerkungen

- Deckel und Flaschenrand sauber und trocken halten, besonders nach der Temperierung im Wasserbad (um Kontaminationen zu vermeiden!)
- Zu Passagenzahl: beim Passagieren von Zellen wird immer eine Passage dazu addiert.
- Bei Verwendung der Neubauerzählkammer ist darauf zu achten, dass die Zellzahl pro Quadrant etwa 10-100 Zellen beträgt und mindestens 2 Quadranten ausgezählt werden; ggf. Zellsuspension höher verdünnen und Verdünnungsfaktor von Trypanblau bei Berechnung beachten.
- Empfindliche Zellen können alternativ mit schonenderen Verfahren passagiert werden z.B. Accutase. Für den Fall bitte individuelle SOPs beachten. Ggf. kann auch auf eine Enzymbehandlung verzichtet werden, wenn Zellen sich rein durch mechanisches Spülen von der Oberfläche lösen.

1. Materialien

- Sterile Einmalpipetten
- Sterile Pasteurpipetten
- Eppendorfpipetten mit sterilen, gestopften Spitzen
- Low binding plastic Röhrchen (grüner Deckel)
- 1,5 ml Eppi
- Spatel
- 6-Well-Platten Thermo-nunc #140675 mit Nunclon Delta Surface (aus Bioreaktorraum)

2. Geräte

- Sterilbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Mikroskop
- Wasserbad
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Mikrowaage (MSC-Labor 2. Stock)

3. Lösungen

- DMEM-F12 **ohne L-Glutamin** (Invitrogen, # 11330-057)
- E8 Basalmedium (Gibco, # A15169-01) **oder** mTeSR-1-Basalmedium (Stem Cell Technologies, # 05850)
- Supplemente für E8-Basalmedium (Gibco, # A15171-01) oder Supplemente für mTeSR-1-Basalmedium (Stem Cell Technologies, # 05852)
- Matrigel red GF (BD Biosciences, # 354230) (-20°C im -80°-Raum) 116,3µl mit 8,6mg/ml
- Dispase (Gibco, # 17105-041) (Kühlschrank im Bioreaktorraum)
- Apoptoseinhibitor ROCK = Y 27632

4. Durchführung

- **2x 6-Well-Platten mit Matrigel beschichten**
 - o 12ml DMEM-F12 **ohne L-Glutamin** in 50ml Falcon vorlegen
 - o 1 Aliquot Matrigel (116,5µl) aus -20°C gefroren mit 1ml kaltem DMEM-F12 auftauen und im restlichen Medium im Falcon resuspendieren
 - o kurz mischen und sofort 1ml/Well in 2 6-Well-Platten verteilen
 → **Matrigel geliert bei Raumtemperatur, aus dieem Grund muss zügig gearbeitet werden!**
 - o Wellplatten mit geschlossenem Deckel 1h unter der Sterilbank inkubieren lassen, dann sofort verwenden, oder 1ml DMEM-F12/Well hinzufügen und im Kühlraum mit Parafilm abgedichtet bis zu max. 1 Woche lagern.

- **Zellen ablösen mit Dispase**

- Pro Well wird 1ml 2mg/ml Dispase benötigt, kann auf Vorrat abgewogen werden, muss allerdings immer frisch in DMEM-F12 aufgelöst verwendet werden.
- Dispase großzügig ansetzen, da Volumenverlust beim Sterilfiltrieren!
- entsprechende Menge Dispase auf der Mikrowaage in einem Eppi abwiegen.
- mit entsprechendem Volumen DMEM-F12 lösen, sterilfiltrieren und auf 37°C erwärmen
- Kulturen mikroskopisch auf Homogenität überprüfen, evtl. auskratzen oder manuell picken
- Medium absaugen, 1 Pasteurpipette / Platte
- 1ml Dispase / Well bei 37°C im Brutschrank inkubieren
 - E8-Zellen beginnen sich nach ca. 5' zu lösen
 - mTSR1-Zellen beginnen sich nach ca. 5'-7' zu lösen
- sobald sich die Zellen an den Kolonierändern lösen, Dispase absaugen
- Wells 3x vorsichtig mit 1ml / Well DMEM-F12 spülen, Medium zwischen den Spülgängen absaugen
- Zellen mit einer 1000er Eppendorf mit 1ml / Well kräftig vom Wellboden spülen, max. 5x / Well spülen, Kolonien lösen sich sichtbar vom Well ab und können in einem 50er Falcon gesammelt werden
- diesen Vorgang so oft mit neue Medium wiederholen, bis alle Zellen geerntet sind (1-3x)
- gepoolte Zellen 3 min bei 200g zentrifugieren
- Den Anteil der Zellen, die weiterkultiviert werden sollen, entnehmen, mit entsprechendem Volumen des Kulturmediums vorsichtig resuspendieren und neu in einer mit Matrigel beschichteten 6-Well-Platte aussäen.
 - E8-Zellen 1:12 bis 1:16
 - mTeSR-1-Zellen 1:6 bis 1:9
- Endvolumen in der Kultur 2ml / Well
- Zugabe von **10µM ROCK** als Apoptoseinhibitor = Y 27632 (im -20°C im Bioreaktorraum, Stock-konz. 10mM) für **24h** (1µl / 1ml Medium)

5. Bemerkungen

- Die Medien nicht länger als 2 Tage verwenden, da die Wachstumsfaktoren durch mehrfaches erwärmen an Aktivität verlieren.
- Beim Splitten darauf achten, dass die Zellen einer Wellplatte erst mal gepoolt werden und dann neu ausgesät werden (Sonst Selektionsgefahr).

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>PFA-Fixierung</p> <p>Histologie</p>
---	---

Seite 1 von 2

1. Materialien

- 6well-Platte oder Zentrifugenröhrchen
- Glaspipetten
- Pasteurpipetten
- Einbettkassetten und Filterpapier
- Glasmesskolben (5 L, mit Stopfen)
- Einmalpipette
- lösungsmittelfester Stift

2. Geräte

- Abzug
- Pipettierhilfe
- Heizrührer
- Einbettautomat

3. Chemikalien

- 4% gepuffertes PFA (Roti-Histofix 4%, #P087.2, Carl Roth) oder selbst herstellen (s. unten)
- 1 N NaOH
- 1 N HCl

4. Lösungen

- PBS⁻
- Leitungswasser

5. Durchführung

Herstellung von 4% Paraformaldehyd-Lösung (4% PFA):

ACHTUNG: Alle Arbeitsschritte unter dem Abzug durchführen, da starke Staubeentwicklung → PFA ist krebserregend!

- 4,5 l PBS⁻ im Messkolben vorlegen, Magnetrührstäbchen vorsichtig zugeben, Messkolben auf den Magnetrührer stellen
- 200 g Paraformaldehyd über den Pulvertrichter in den Messkolben geben, Becher, Löffel und Trichter mehrfach mit PBS⁻ aus- bzw. abspülen, um das gesamte Pulver in den Messkolben zu überführen, rühren
- Messkolben mit Stopfen verschließen, auf den Heizrührer stellen und Temperatur auf max. 60°C einstellen, bis zum vollständigen Lösen rühren lassen (dann den Heizrührer ausschalten!!!)
- abkühlen lassen
- pH-Elektrode mit VE-Wasser abspülen, so in den Messkolben hängen, dass die Messstelle sich knapp unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befindet
- pH-Wert des Puffers durch (langsame) Zugabe von 1 N HCl- bzw. 1 N NaOH-Lösung auf 7,4 einstellen
- Messkolben vom Magnetrührer nehmen, Magnetrührstäbchen mit Magnetstab entfernen
- mit PBS⁻ auf 5 l Endvolumen auffüllen
- Messkolben mit Stopfen verschließen, 2-3x umschwenken, um vollständig zu durchmischen
- portionsweise einfrieren

Erstellt von: Steinke/Amrehn

Gültig ab: 06.09.2010

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>PFA-Fixierung</p> <p>Histologie</p>
--	---

Seite 2 von 2

Fixieren von Gewebe:

- Gewebe durch Spülen mit PBS⁻ von Medienresten befreien und in geeignetes Fixierungsgefäß (z.B. 6well-Platte oder Zentrifugenröhrchen) überführen
- **Ab hier unter dem Abzug weiterarbeiten:**
- Gewebe in 4% PFA tränken (**Einmalpipette verwenden und diese unter dem Abzug 2 Tage ausdampfen lassen**)
- Inkubation unter dem Abzug oder bei 4°C mit geschlossenem Deckel (Inkubationszeit und -temperatur ist von der Art des Gewebes abhängig; Hautmodelle/BioVaSc: 2 h, Biopsate: ü.N.)
- PFA mit Einmalpipette in Fixiermittelabfall überführen
- Gewebe mit Leitungswasser spülen, dies auch in Fixiermittelabfall überführen
- Gewebe in Einbettkassetten mit Filterpapier überführen
- 2 Stunden in einem mit Leitungswasser gefüllten Becherglas wässern
- Gefäße und Pipetten, die mit PFA in Berührung gekommen sind, bis zum nächsten Tag unter dem Abzug ausdampfen lassen.
- Gewebe einbetten

6. Bemerkungen

- Beim Arbeiten mit PFA Nitrilhandschuhe tragen!!!
- Beschriftung der Einbettkassetten:

Versuchsdatum, Versuchsname, Fixiertag
Zellzahl, Datum/Kürzel

 Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin	Paraffineinbettung Histologie
--	--

Seite 1 von 1

1. Materialien

- 2ml-Reaktionsgefäße oder 50ml-Zentrifugenröhrchen
- Einbettkassetten
- Einmalpipetten
- Lösungsmittelfester Stift
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Abzug
- Eppendorf-Pipetten
- Wärmeschrank (60°C)

3. Lösungen

- Ethanol (50%, 70%, 90%, 96%)
- Isopropanol = 2-Propanol
- Leitungswasser
- PBS
- Roti-Plast Paraffin (Roth, 6642.6)
- Xylol (Roticlear, #A538.2, Carl Roth)

4. Durchführung

- für manuelle Einbettung: fixierte Präparate in entsprechende Gefäße (z. B. 2ml-Reaktionsgefäße oder 50ml-Zentrifugenröhrchen) überführen
- für Einbettung im Automaten s. Bemerkungen

Zeitablauf [h]	Lösung	Ziel/Bemerkung
1-2 h	Leitungswasser	wässern
ü.N. (Mindestdauer: 1 h)	50% EtOH	Dehydratisierung
1	70% EtOH	
1	90% EtOH	
1	96% EtOH	
1	Isopropanol I	
1	Isopropanol II	
1	Isopropanol/Xylol (1:2)	Inkubieren bei RT
1	Xylol I	
1	Xylol II	
ü.N.	Paraffin I	Inkubieren im Wärmeschrank bei 60°C
2 h	Paraffin II	

5. Bemerkungen

- Für das Einbetten im Einbettautomat werden die Präparate nach dem Fixieren in Einbettkassetten überführt. Nach dem 2-stündigen Auswaschen der Fixierlösung in Leitungswasser werden die Proben in den Einbettautomaten gegeben (hier darauf achten, dass das richtige Programm eingestellt ist!). Die letzten Schritte in Paraffin verkürzen sich im Automaten auf jeweils 3 h.

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel und Trägerkorb
- Glaspipetten
- Deckgläser
- Messzylinder

2. Geräte

- Abzug

3. Lösungen

- DNA- Färbekit nach Feulgen
- 5MSalzsäure 2x 250ml
- Schiffs Reagenz 2x 250ml
- Natriumdisulfit- Konzentrat 1x250ml
- Wasser

4. Durchführung

- **Natriumdisulfit-Waschlösung** **100ml** **300ml**
- Natriumdisulfit-Konzentrat 5ml 15ml
- Wasser 95ml 282ml
- HCl 1ml 3ml

- **Vorbereitung der Proben:**

Proben entparaffinieren und rehydratisieren
 Waschen in Leitungswasser 10min

- **Durchführung:**

Reagenz	Zeit
HCl	50min
Wasser	2min
Wasser	2min
Schiffs Reagenz (in Feuchtekammer Pro Objektträger 1ml)	60min
Natriumdisulfit- Spüllösung	3min
Natriumdisulfit- Spüllösung	3min
Wasser	2min
Wasser	2min
Ethanol 50%	1min
Ethanol 70%	1min
Ethanol 80%	1min
Ethanol 99%	1min
Xylol	1min

Eindecken mit Entellan

5. Bemerkungen

- Zellkerne rot-violett gefärbt, Zytoplasma und Hintergrund sollten ungefärbt sein



Seite 1 von 3

1. Materialien

- Messzylinder
- 250ml-Laborflasche
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläser
- Pinzette

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Abzug

3. Chemikalien und Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser
- Xylol
- Ethanol (absolut, 96%, 70%, 50%)
- Hämatoxylin, sauer nach Mayer (Morphisto: Bestellnummer: 10231)
- optional:
- HCl-Alkohol
 - 100 ml 50% EtOH in Messzylinder vorlegen
 - 13,7 ml 1 M HCl zupipettieren
 - auf 200 ml mit 50% EtOH auffüllen
 - in Schottflasche überführen und gut mischen
- Eosin 1% wässrig (Morphisto, Bestellnummer 10177)
- 2-Propanol = Isopropanol
- organisches Eindeckmittel Entellan (Merck, 1.079.600.500)

4. Durchführung

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
- direkt in Xylol I überführen
- Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!**

 TERM <small>Lehrstuhl Tissue Engineering & Regenerative Medizin</small>	Universitätsklinikum Würzburg 	HE-Färbung Histologie
---	--	---------------------------------

Seite 2 von 3

Zeit	Lösungen	Ziel/Bemerkung
10min	Xylol I	Entparaffinieren, Rehydrieren
10 min	Xylol II	
3 x auf- und abtauchen	EtoH 96%	
3 x auf- und abtauchen	EtoH 96%	
3 x auf- und abtauchen	EtoH 70%	
3 x auf- und abtauchen	EtoH 50%	
	VE-Wasser	
6min	Hämatoxylin sauer nach Mayer (Morphisto)	Färben der Zellkerne
	VE-Wasser	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
(Optional : wenn Färbung zu stark ist) 2x kurz eintauchen	HCl- Alkohol	Differenzieren des Hämaun-Farbstoffes
nach HCl Verwendung	VE-Wasser	Spülen
5min	Leitungswasser	Bläuen unter fließendem Wasser
6min	Eosin	Färben d. Zytoplasma, EZM
	VE-Wasser	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
2x kurz eintauchen	EtoH 70%	aufsteigende Reihe: Entwässern
2	EtoH 96%	
5	Isopropanol I	
5	Isopropanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	

Beachten: Alle Lösungen werden bei Bedarf, wenn z.B. starke Verunreinigungen erkennbar sind, in die halogenfreien organischen Lösemittelabfälle entsorgt!
 Falls nach dem Entparaffinieren die Objektträger weiße Ablagerungen haben, dann die Alkoholreihe wieder bis ins Xylol zurückgehen und alle Alkohole und Xylol erneuern. Danach nochmals 10 min in Xylol bleiben und dann nochmal die absteigende Alkoholreihe wiederholen.

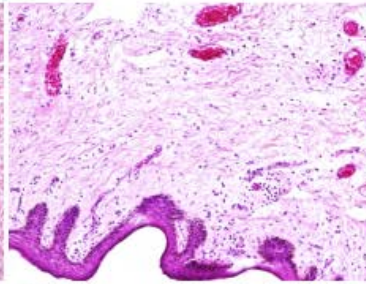
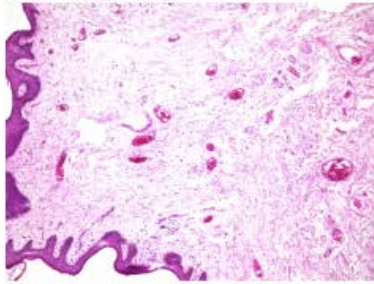
- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen
- mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern


 TERM <small>Lehrstuhl Tissue Engineering & Regenerative Medizin</small>	Universitätsklinikum Würzburg 	HE-Färbung Histologie
---	---	---------------------------------

Seite 3 von 3

5. Ergebnis

- Die Zellkerne sind blau, das Zytoplasma und die Extrazellulärmatrix sind rot angefärbt (Übersichtsfärbung).



 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Pentachrom-Färbung nach Movat</p> <p>Histologie: Färbungen</p>
---	---

Seite 1 von 3

1. Materialien

- Messzylinder
- 250ml-Laborflasche
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläser
- Pinzette

2. Geräte

- Abzug
- Wärmeschrank (60°C)

3. Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser

4. Chemikalien


- Xylol
- Ethanol (96%, 70%, 50%)
- Alicanblau: 1g Alicanblau + 1ml konz. Essigsäure + 100ml VE-Wasser
- Eisenhämatoxylin:
 - Lösung A: 1g Hämatoxylin in 100ml 96% EtOH lösen (unter Erwärmung, bis Farbe rotbraun erscheint)
 - Lösung B: 2,48 g Eisen-III-Chlorid Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) in 100ml VE-Wasser lösen + 1ml konz. HCL, oder 1,16g Eisenchlorid und 1ml 25%ige HCL in 100ml VE-Wasser lösen
- Brilliant Crocein-Säurefuchsin
 - Lösung A: 0,1g Brilliant Crocein R + 0,5ml konz. Essigsäure und 99,5ml VE-Wasser
 - Lösung B: 0,1g Säurefuchsin + 0,5ml konz. Essigsäure und 99,5ml VE-Wasser
 - Gebrauchslösung: 8 Teile Lösung A und 2 Teile Lösung B, mehrere Monate haltbar
- Saffron du Gatinais: 6g Saffron du Gatinais in 100ml 96%igem EtOH lösen; 48h bei 50°C in luftdichter Flasche extrahieren (unter Luftabschluss, also wasserfrei haltbar) + lichtempfindlich!
- Alkalischer Alkohol: 10ml Ammoniumhydroxid + 90ml 96%iger EtOH (oder 180ml 95%iger EtOH + 20ml konz. NH_3)
- 5%ige Phosphorwolframsäure
- konz. 0,5%ige Essigsäure
- konz. HCL

5. Durchführung

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
- direkt in Xylol I überführen
- ➔ Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Erstellt von: Wagner/Amrehn

Gültig ab: 22.02.2011

 Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin	Pentachrom-Färbung nach Movat Histologie: Färbungen
--	--

Seite 2 von 3

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
10	Xylol I	absteigende Reihe: Entparaffinieren, Rehydrieren
10	Xylol II	
3 x auf und ab tauchen	EtOH 96% I	
3 x auf und ab tauchen	EtOH 96% II	
3 x auf und ab tauchen	EtOH 70%	
3 x auf und ab tauchen	EtOH 50%	
	VE-Wasser	schwenken, bis keine Turbulenzen mehr entstehen
10	Alcianblau	Färbung von negativ geladenen sulfatierten Proteoglykanen
5	VE-Wasser	spülen, hydratisieren
60	alkalischer Alkohol	Fixierung von Alcianblau
5	VE-Wasser	spülen (fließendes Wasser)
10	Eisenhämatoxylin	Färbung der Zellkerne
1	VE-Wasser	spülen (fließendes Wasser)
15	Leitungswasser	wässern
30	Brilliant Crocein Säurefuchsin	Färbung der elastischen Fasern und des Zytoplasmas
	0,5%ige Essigsäure	spülen
15	5%ige Phosphorwolframsäure	differenzieren
5	0,5%ige Essigsäure	spülen, bewegen
2x5	100%iger EtOH	spülen
60	Saffron du Gatinais	Färbung von mineralisiertem Knochen- und Kollagengewebe
2x4	96%iger EtOH (immer neu!)	entwässern
5	Xylol	aufhellen

Beachten: Alle Lösungen werden bei Bedarf, wenn z.B. starke Verunreinigungen erkennbar sind, in die halogenfreien organischen Lösemittelabfälle entsorgt!

Falls nach dem Entparaffinieren die Objektträger weiße Ablagerungen haben, dann die Alkoholreihe wieder bis ins Xylol zurückgehen und alle Alkohole und Xylol erneuern. Danach nochmals 10 min in Xylol bleiben und dann nochmal die absteigende Alkoholreihe wiederholen.

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen
- mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern

6. Ergebnis

- Mineralisierte Knochen- und Kollagengewebe: gelb (Saffron du Gatinais)
- Proteoglykane (mineralisierter Knorpel): blau (Alcianblau)
- Elastische Fasern, Zytoplasma: rot (Brilliant Crocein-Säurefuchsin)
- Zellkerne: braun-schwarz (Eisenhämatoxylin)

Erstellt von: Wagner/Anrehn

Gültig ab: 22.02.2011

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Pentachrom-Färbung nach Movat</p> <p>Histologie: Färbungen</p>
---	--


Seite 3 von 3

7. Bemerkungen

- Schnitte nur in der ersten Hälfte des Trägers platzieren, da nur wenig Saffron-Lösung vorhanden (verdampft und ist teuer!). Nach Gebrauch wieder lichtgeschützt und Parafilm abgedichtet lagern.



- Eisenhämatoxylin-Färbelösung vor Gebrauch filtrieren oder ggf. neu ansetzen.

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem</p> <p>Immunhistologie</p>
--	--

Seite 1 von 3

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel und Trägerkorb
- Pasteurpipetten
- Deckgläser
- Reaktionsgefäße
- Feuchtkammer
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Eppendorf-Pipetten

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Isotyp-Kontrolle
- PBS-Waschpuffer mit 0,5% Tween-20
- Antigendemaskierungs-Puffer: entsprechend des Primärantikörpers
- 3% H₂O₂ (immer frisch ansetzen und dunkel aufbewahren)
- Antikörper-Verdünnungslösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme #ALI20R500)
- Hämalalaun
- ab- bzw. aufsteigende Alkoholreihe, Roticlear (entspricht Xylol)
- organisches Eindeckmittel
- ggf. Blocklösung:
 - (A) 1% FISH Skin(0,1 g), 0,3% Triton-X 100 (30 µl), 1%BSA (0,1g) in PBS (9970 µl)
 - (B) 0,5% BSA in PBS

Detektionssystem:

DCS Super Vision 2 HRP-Polymer-Kit (DCS Innovative Diagnostik-Systeme PD000KIT):

DCS Polymer-Enhancer (Link): sekundäre Anti-Maus IgG und Anti-Kaninchen IgG

DCS HRP-Polymer-Reagenz (Label): mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus- und Kaninchen-AK

Substrat-Chromogen: DAB - Konzentrat (3,3'-Diaminobenzidin) und DAB Substratpuffer

(AEC+ Substratchromogen (3-Amino-9-Ethylkarbazol) oder) **Alle Chromogene sind licht- und stark temperaturempfindlich und sollten nur so kurz wie möglich auf Zimmertemperatur gebracht werden!**

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffiniert und eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden.

Bei Fixierung mit PFA (auch Kryoschnitte) erfolgt in der Regel eine Antigendemaskierung.

Werden Zellen auf Chamber Slides oder Cytospots gefärbt, kann nach entsprechender Fixierung (z. B. Ethanol:Aceton 1:1) und dem Überführen in Waschpuffer sofort mit dem Schritt „Überschichten mit dem Antikörper“ begonnen werden.


Vorbereitung der Schnitte:

- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle!
- schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 38°C im Wärmeschrank lagern
- in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin sollte geschmolzen sein!)
- direkt in Roticlear I überführen

Beachten: Ab hier dürfen die Schnitte nicht mehr trockenfallen!

Erstellt von: Amrehn / Steinke

Gültig ab: 21.11.2013

 Universitätsklinikum Würzburg Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin	Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem Immunhistologie
--	--

Seite 2 von 3

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
10	Roticlear I	absteigende Reihe: Entparaffinieren, Rehydratisieren
10	Roticlear II	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 96% vergällt	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 70% vergällt	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 50% vergällt	
	VE-Wasser	Schwenken

Demaskierung der Epitope A (hitzeinduzierte Epitopmaskierung):

- Demaskierung der Schnitte in entsprechendem 1x Puffer (90-100°C vorgewärmt im Dampfgarer/**Schnellkochtopf**, 20 min/**10 min**)
- in VE Wasser überführen und mit Fettstift umranden, danach in Waschpuffer geben

Demaskierung der Epitope B (enzymatische Demaskierung mit Enzymen wie Pepsin, Proteinase K...):

- Schnitte mit Fettstift bzw. Diamantstift umranden
- Enzym auftauen und 50-100 µl auf den Schnitt pipettieren
Inkubation bei RT (oder 37°C) 12 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

IHC-Vorbereitung

- Herstellung der AK-Verdünnung mit Antikörper-Verdünnungslösung:
- Negativkontrolle: mit IgX, Proteinkonzentration auf gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers einstellen (IgX)
- Ist die AK-Konzentration unbekannt, erfolgt die Negativkontrolle nur mit der AK-Verdünnungslösung


Blockieren der zelleigenen Peroxidase (optional, wichtig für Zellen, die endogene Peroxidasen besitzen, z.B. Zellen aus dem Blut/Knochenmark):

- Schnitte mit 3% H₂O₂ in VE-H₂O(50-100 µl pro Schnitt/Kammer/Spot) behandeln
10 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

Bei Bedarf Schnitte mit Blocklösung zur Hintergrundreduzierung behandeln 30 minÜberschichten mit 50-100 µl primären Antikörper bzw. IgG-Kontrolle in entsprechender Verdünnung

- Inkubation abhängig vom Primärantikörper, Richtwerte: 60 min bei RT oder üN bei 4°C
- AK-Lösung bzw. IgG-Kontrolle abtropfen
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min

!!! Ab hier im Dunkeln weiterarbeiten

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem</p> <p>Immunhistologie</p>
---	--

Seite 3 von 3


- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen **Polymer-Enhancer**
- Inkubation bei RT 10 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen **HRP-Polymer**
- Inkubation bei RT 20 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit DAB Lösung (Lösung ist 1 Woche bei 4°C haltbar)
- Inkubation: (Sichtkontrolle!! Zwischen 30 sec bis 10 min!! I.d.R. 5 min)
- in Waschpuffer überführen
- Gegenfärbung mit Hämalauin 30-45 sec
- Bläuen in Leitungswasser 60-90 sec
- Überführen in VE Wasser

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
2x kurz eintauchen	Ethanol 70% vergällt	aufsteigende Reihe:
2	Ethanol 96% vergällt	Rehydratisieren
2	2-Propanol I	
3	Roticlear I	
3	Roticlear II	

- Eindecken in organischem Eindeckmittel **oder** lufttrocknen lassen und danach in Roticlear eintauchen und mit organischem Eindeckmittel eindecken
- Eindecken mit organischem Eindeckmittel **nur** unter dem Abzug!
- Schnitte ü.N. unter dem Abzug trocknen lassen und am nächsten Tag wegräumen!

5. Bemerkungen

- DAB ansetzen (unbedingt Handschuhe tragen, kein Hautkontakt!): 1ml DAB Substratpuffer + 1 Tropfen DAB-Konzentrat
- AK-Verdünnungslösungen sind 4 Wochen bei 4°C haltbar
 - Die nötige Vorbehandlung und die einzusetzenden Antikörperkonzentrationen sind in der AK-Liste aufgeführt.
 - Gegebenenfalls ist eine zusätzliche Permeabilisierung der Schnitte nötig
 - Die Arbeitsschritte können in Abhängigkeit vom Primärantikörper variieren

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunfluoreszenz mit Fluorochrom</p> <p>Immunfluoreszenz</p>
---	--

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel, mit Alufolie umwickelt
- Deckgläser
- Reaktionsgefäße
- Feuchtekammer
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Eppendorf-Pipetten
- Schüttler

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Sekundärantikörper
- Normalserum zum Blocken
- Isotyp-Kontrolle
- Waschpuffer PBS/TBS + Tween-20 (0,5%)
- Roticlear (entspricht Xylol) und absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren bzw. Entwässern
- Antigendemaskierungs-Puffer: entsprechend des Primärantikörpers
- zur Vorbereitung der Chamber Slides und Cytospots: 0,2% Triton-X100 in PBS
- ggf. Blocklösung: 1% FISH Skin(0,1g), 0,3% Triton-X 100 (30 µl), 1%BSA (0,1 g) in PBS (9970 µl)
- Antikörper-Verdünnungslösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme #AL120R500)
- MOVIOL DABCO mit 0,1% DAPI oder Fluoromount G

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffiniert und je nach Antikörper eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden.

Werden Zellen auf Chamber Slides oder Cytospots gefärbt, muss mit 0,2% Triton-X100 in PBS 5 min. vorbehandelt werden.

Gefrierschnitte werden je nach Fixierung weiter behandelt.

Vorbereitung der Schnitte:


- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle!
- schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 38°C im Wärmeschrank lagern
- in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
- direkt in Roticlear I überführen

Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
10	Roticlear I	absteigende Reihe: Entparaffinieren, Rehydratisieren
10	Roticlear II	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 96%	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 70%	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 50%	
	VE-Wasser	Schwenken
		Überführung in Waschpuffer

Erstellt von: Amrehn/Steinke

Gültig ab: 16.09.13

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunfluoreszenz mit Fluorochrom</p> <p>Immunfluoreszenz</p>
---	--

Seite 2 von 2

Demaskierung der Epitope (hitzeinduzierte Epitopmaskierung):

- Demaskierung der Schnitte in entsprechendem 1x Puffer (100°C vorgewärmt im Dampfgarer für 20 min)
- Schnitte sofort in Waschpuffer überführen und mit Fettstift umranden

Demaskierung der Epitope (enzymatische Demaskierung):

- Schnitte mit Diamantstift umranden
- Enzymlösung auf den Schnitt pipettieren, Inkubation (s. entsprechendes Datenblatt)
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

Vorbehandlung der Chamber Slides und Cytospots bei intrazellulären Antigenen

- 0,2% Triton-X100 in PBS 5 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

IF-Färbung

- 5% Normalserum (aus derselben Spezies wie der Sekundäntikörper) in AK-Verdünnungslösung verdünnen zum Blocken 20 min
- Primäntikörper (z.B. mouse AB1 und/oder rabbit AB1)
- Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit vom Primäntikörper
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Sekundäntikörper mit Fluorochrom in AK-Verdünnungslösung verdünnen (z.B. donkey anti-mouse-Cy5 und/oder donkey anti-rabbit-Cy2)
- Inkubation bei RT (im Dunkeln) 60 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min

Beispielprotokoll für eine Doppelfärbung, bei der beide Primäntikörper aus derselben Spezies (mouse) stammen

- 5% Normalserum (aus derselben Spezies wie der Sekundäntikörper) in AK-Verdünnungslösung verdünnen zum Blocken 20 min
- Inkubation mit dem ersten Primäntikörper (mouse AB1)
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Inkubation mit dem ersten Sekundäntikörper (z.B. donkey anti-mouse-Cy5)
- Inkubation bei RT (im Dunkeln) 60 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- **5% Normalserum (mouse) in AK-Verdünnungslösung** **20 min**
- **Inkubation mit dem zweiten Primäntikörper (mouse AB2)**
- **3x Waschen mit Waschpuffer** **je 5 min**
- **Inkubation mit dem zweiten Sekundäntikörper (z.B. donkey anti-mouse-Cy2)**
- **Inkubation bei RT (im Dunkeln)** **60 min**
- **3x Waschen mit Waschpuffer** **je 5 min**
- eindecken mit MOVIOL DABCO mit 0,1% DAPI, Fluoromount G + DAPI je nach Fluorochrom
- üN trocknen lassen, dunkel lagern!

5. Bemerkungen

Vor der erstmaligen Durchführung von Mehrfachfärbungen: Ablauf bitte mit Christa besprechen!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sebastian Schürlein

Nationalität: deutsch

Studium:

seit Juni 2011	Promotion „Entwicklung von Technologien zur Optimierung von Tissue Engineering Prozessen, belegt am Beispiel der Herstellung von kardialen Gewebe
seit Januar 2016	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universitätsklinikum Würzburg
Januar 2013 bis Dezember 2014	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer IGB
Juni 2011 bis Dezember 2012	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universitätsklinikum Würzburg
September 2010 bis Mai 2011	Erstellen einer Masterthesis am orthopädischen Zentrum für muskuloskelettale Forschung in Würzburg „Entwicklung Kollagen II-basierter Nanofaserkonstrukte zur Gelenkknorpelregeneration: Biomimetische Zellträger für die matrixgekoppelte autologe Zelltransplantation“
Oktober 2009 bis Mai 2011	Masterstudium an der Hochschule Sigmaringen, Studiengang Biomedical Engineering
Mai 2009 bis September 2009	Erstellen einer Bachelorthesis in den Laboren der Hochschule Sigmaringen „Induktion und Nachweis einer CC-TT Transition im p53-Gen in primären Keratinozyten und Fibroblasten“
März 2008 bis September 2008	integriertes Praxissemester bei der Firma Merkle GmbH, in der Galenik für „feste Arzneiformen“, Blaubeuren <ul style="list-style-type: none"> • Qualifizierung von Anlagen
März 2006 bis September 2009	Bachelorstudium an der Hochschule Sigmaringen, Studiengang Pharmatechnik
Oktober 2005 bis Februar 2006	ein Semester Bachelorstudium an der Fachhochschule in Aalen, Studiengang Kunststofftechnik

Berufliche Ausbildung:

September 2001 bis August 2004 Ausbildung zum Werkzeugmacher in der Firma HEIBI Metall
Birmann GmbH, Schopfloch

Schulische Ausbildung:

September 2004 bis August 2005 Fachhochschulreife, Berufsoberschule, Ansbach

September 1993 bis August 2001 Gymnasium, Feuchtwangen

Ort, Datum

Unterschrift

Publikationsliste

Artikel in Journalen:

Moll C, Reboredo J, Schwarz T, Appelt A, **Schürlein S**, Walles H, Nietzer S: Tissue Engineering of a human 3D in vitro tumor test system. *Journal of Visualized Experiments*, 2013; 78:e50460

Schuerlein, S., Schwarz, T., Krzimirski, S., Gätzner, S., Hoppensack, A., Schwedhelm, I., Schweinlin, M., Walles, H. and Hansmann, J. (2016), A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering. *Biotechnology Journal*. Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/biot.201600326

Beiträge auf Konferenzen:

3th International Conferences: Strategies in Tissue Engineering (Würzburg, Mai 2012)

Poster: „Tissue Engineering of human 3D cardiac muscle patches“

Schürlein S., Leyh R., Hönig A., Zdzieblo D., Müller A., Gattenlöhner S., Walles H.

3rd TERMIS World Congress (Wien, August 2012)

Poster: „Engineering of human 3D cardiac muscle patches based on a biological scaffold and specific bioreactor technology“

Schürlein S., Leyh R., Hönig A., Zdzieblo D., Müller A., Gattenlöhner S., Walles H.

The 17th Annual Hilton Head Workshop – Regenerative Medicine (Hilton Head, März 2013)

Poster: „Development of a human cardiac muscle patch using a three-dimensional scaffold and custom bioreactor technologies“

Schürlein S., Hansmann J., Schwarz T., Schenke-Layland K., Walles H.

Keystone Symposia Cardiac Remodeling, Signaling, Matrix and Heart (Salt Lake City, April 2013)

Poster: „Development of a human cardiac muscle patch using a three-dimensional scaffold and custom bioreactor technologies“

Schürlein S., Hansmann J., Schwarz T., Schenke-Layland K., Walles H.

1st Annual Conference 2013 of the German Stem Cell Network (GSCN): (Berlin, November 2013)

Poster: „Development of a human cardiac muscle patch using a three-dimensional scaffold and custom bioreactor technologies“

Schürlein S., Hansmann J., Schwarz T., Schenke-Layland K., Walles H.

Fraunhofer Life Science Symposium "Medical Cell Products" (Leipzig, Oktober 2014)

Poster: „Establishment of a customized 3D myocard model by seeding human iPS-derived cardiomyocytes on small intestinal submucosa scaffold (BioVaSc®)“

Schürlein S., Kadari A., Walles H., Edenhofer F.

4th International Conferences: Strategies in Tissue Engineering (Würzburg, Juni 2015)

Poster: „ An engineered 3D myocardial model of human iPS-derived cardiomyocytes on small intestinal submucosa scaffold“

Schürlein S., Kadari A., Walles H., Edenhofer F.

4th International Conferences: Strategies in Tissue Engineering (Würzburg, Juni 2015)

Vortrag: „ Modular bioreactor platform for Tissue Engineering applications.“

Schürlein S., Schwarz T., Krzimirski S., Gätzner S., Hoppensack A., Saam J., Walles H., Hansmann J.

ISSCR Annual Meeting 2016 (San Francisco, Juni 2016)

Poster: „ An engineered 3D myocardial model of human iPS-derived cardiomyocytes on small intestinal submucosa scaffold“

Schürlein S., Kadari A., Walles H., Edenhofer F., Hansmann J.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung von Technologien zur Optimierung von Tissue Engineering Prozessen am Beispiel der Herstellung von kardialem Gewebe“ eigenständig, das heißt insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Development of technologies to optimize tissue engineering processes, documented on the example of the generation of cardiac tissue” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Heike Walles** für die Möglichkeit der Promotion am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Uniklinikums Würzburg bedanken. Ich danke ihnen besonders für die fachliche Betreuung, die vielen Möglichkeiten, die mir hier geboten werden und das entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die fachlichen Anregungen und die Übernahme des Amtes als Zweitgutachter.

Prof. Dr. Frank Edenhofer gilt mein Dank für die sehr gute Kooperation auf dem Gebiet der iPS-Zellen, die konstruktiven Anregungen und die Betreuung meiner Doktorarbeit als Drittgutachter.

Ein besonderer Dank gilt **Dr. Jan Hansmann** für die fachliche Betreuung meiner Arbeit, die uneingeschränkte Unterstützung und die wertvollen Anregungen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gebührt **Thomas Schwarz** für die Unterstützung in allem was mit Technik zu tun hatte und dass du für jedes Problem eine Lösung parat hattest.

Mein Dank geht ebenso an **das Team von Prof. Dr. Frank Edenhofer** für die Milliarden an Kardiomyozyten und die Unterstützung die ich erhalten habe.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei unserem Herzmuskel-Team, bestehend **aus Martina Werner, Carolin Beck, Reem Al-Hijailan** und **Dr. Marcus Leistner** für die große Hilfe bei der Explantation und Dezellularisierung der Schweineherzen sowie der täglichen Arbeit in der Zellkultur.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen aus dem iPS-Zell-Team, bestehend aus **Dr. Daniela Zdzieblo, Sabine Wilhelm, Antje Appelt-Menzel, Alevtina Cubukova** sowie **David Fecher** bedanken, dass meine Zellen die Wochenenden und Feiertage überlebt haben.

Bei meinen **Mitdoktoranden** und **Kollegen des Lehrstuhls** möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und die interessanten sowie anregenden Gespräche bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich **meiner Familie** für die Unterstützung, insbesondere danke ich **meinen Eltern**, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau **Dr. Angelika Konold-Schürlein** für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr Verständnis dafür, dass ich einige Wochenenden und Feiertage, zumindest teilweise, im Labor verbracht habe.