

**Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
(TERM)
des Universitätsklinikums Würzburg
Kommissarische Leitung: Professor Dr. Jürgen Groll**

Titel:

Herstellung und Qualitätskontrolle einer vaskularisierten Trägerstruktur zur
Blasenrekonstruktion

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Alena Wagner
aus Strullendorf**

Würzburg, März 2024

Referent: Priv.-Doz. Dr. Oliver Pullig
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Groll,
i.V. Prof. Dr. Matthias Eyrich
Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Haaf

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2024

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für Papa und Oma

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Regenerative Medizin und Tissue Engineering.....	5
1.2	Matrices und Zellquellen zur Produktherstellung.....	6
1.3	Arzneimittel für neuartige Therapien	7
1.4	Ursache und Behandlung von Blasendefekten	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothese	11
2	Material	12
2.1	Verwendete porcine Ausgangsgewebe für die UroVaSc.....	12
2.2	Reagenzien für die Zellkultur	13
2.3	Puffer und Lösungen.....	14
2.4	Antikörper.....	14
2.5	Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie	15
2.6	Verbrauchsmaterial.....	16
2.7	Laborgeräte	17
2.8	Software	19
2.9	Bioreaktortechnik.....	19
3	Methoden	21
3.1	Dezellularisierung des porcinen Jejunums	21
3.2	Zellkultur	23
3.2.1	Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen aus porciner Haut.....	23
3.2.2	Kryokonservierung von Zellen.....	26
3.2.3	Aufreinigung der Primärkultur mit Antikörper-gekoppelten Microbeads	26
3.2.4	Subkultivierung der Zellen	28
3.2.5	Bestimmung der Zellzahl.....	28

Inhaltsverzeichnis

3.2.6	Charakterisierung der Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie.....	29
3.2.7	Charakterisierung der Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz.....	30
3.3	Herstellung des endothelialisierten Augmentats.....	31
3.3.1	Besiedlung und Reifung des Gefäßsystems.....	32
3.4	Qualitätskontrolle des endothelialisierten Augmentats	33
3.4.1	Histologie	34
3.4.1.1	Herstellung der Proben.....	34
3.4.1.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung	35
3.4.1.3	Feulgen Färbung.....	36
3.4.1.4	Immunhistologie.....	37
3.4.1.5	Immunfluoreszenz.....	38
3.4.2	Bestimmung des Gallsäuregehalts.....	39
3.4.3	Nachweis der Zellviabilität mit MTT	39
3.4.4	Bestimmung des Endotoxingehalts	39
3.4.5	Nachweis von Mykoplasmenkontamination	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Entnahme der Hautbiopsie.....	41
4.1.1	Schablonenentwicklung.....	41
4.1.2	Spenderregion der Hautbiopsie	42
4.2	Herstellung und Kultivierung der primären Endothelzellkultur	43
4.2.1	Zellausbeute.....	43
4.2.2	Isolationszeitpunkt.....	44
4.2.3	Expansion der Zellen	45
4.2.3.1	Problemstellung Mischkultur	45
4.2.3.2	Aufreinigung der Primärkultur mit Microbeads.....	46
4.2.3.3	Einfluss einer Gelatinebeschichtung der Kulturgefäße.....	50

4.2.3.4	Wachstumsverhalten der Endothelzellen	51
4.3	Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen.....	51
4.3.1	Morphologie	52
4.3.2	Durchflusszytometrie.....	53
4.3.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	55
4.4	Herstellung des autologen Blasenaugmentats.....	56
4.4.1	Besiedlung des Gefäßsystems	56
4.4.2	Kultur des Augmentats	57
4.5	Qualitätssicherungsmaßnahmen am endothelialisierten Augmentat	60
4.5.1	Experiment I	60
4.5.2	Experiment II.....	61
4.5.3	Experiment III.....	63
4.5.4	Experiment IV	65
4.5.5	Endotoxin- und Mykoplasmenmessung	66
4.6	GMP konformes Freigabeprotokoll.....	67
4.6.1	Freigabe der Zwischenprodukte	67
4.6.2	Freigabe des Endproduktes.....	69
5	Diskussion	71
5.1	Isolation und Kultivierung der Endothelzellen.....	71
5.1.1	Spendervarianz	72
5.1.2	Reinheit der Endothelzellkultur.....	73
5.2	Herstellung des autologen Blasenaugmentats.....	76
5.2.1	Bioreaktor- und Inkubator-technologie.....	76
5.3	Qualitätskontrollen im Herstellungsprozess	79
5.3.1	Charakterisierung der Endothelzellen	79
5.3.2	Freigabe der UroVaSc	81

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung	83
7	Summary	85
8	Literaturverzeichnis	87
	I. Abkürzungsverzeichnis.....	
	II. Abbildungsverzeichnis.....	
	III. Tabellenverzeichnis.....	
	IV. Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Weltweit warten viele Menschen vergeblich auf ein Spenderorgan. Der Jahresbericht "Organspende und Transplantation in Deutschland 2021" der Deutschen Stiftung Organtransplantation zeigt, dass alleine in Deutschland im Jahr 2021 8.730 Organe benötigt wurden. Lediglich 3.508 Organe konnten transplantiert werden (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2022). Die Transplantation von 5.222 weiteren benötigten Organen ist ausgeblieben, zum Leid vieler erkrankter Menschen. Es stehen häufig keine passenden Spenderorgane rechtzeitig zur Verfügung und trotz neuer chirurgischer Methoden kann der immer steigende Bedarf nicht gedeckt werden.

Umso mehr gewinnt heutzutage die regenerative Medizin an Bedeutung. Sie vereint die Fachrichtungen Immunologie, Zellbiologie, Gentherapie, Ingenieurwesen, Biomaterialien und das Tissue Engineering. Ziel der regenerativen Medizin ist es, beschädigtes oder zerstörtes Biomaterial wie Zellen, Gewebe, Knochen oder Organe mit Hilfe biologischer Transplantate, oder durch Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse, vollständig zu regenerieren oder zumindest teilweise in ihrer Funktion wiederherzustellen (Berthiaume et al., 2011). Als Teilgebiet der regenerativen Medizin konzentriert sich das Tissue Engineering auf die Herstellung funktioneller Konstrukte aus biokompatiblen Trägerstrukturen, Zellen und biologisch aktiven Molekülen, um beschädigtes Gewebe oder ganze Organe zu ersetzen. Künstliche Haut oder Knorpel sind Beispiele für technisch hergestelltes Gewebe (Amirsadeghi et al., 2020) (Kwon et al., 2019). Eine zentrale Rolle hierbei spielt die Isolation, Kultivierung und Expansion von primären Zellen aus kleinen Spenderbiopsien. Die Zellen werden je nach Herstellungsprozess auf Gerüsten zu dreidimensionalen Gewebestrukturen kultiviert und können anschließend als Transplantat oder Implantat eingesetzt werden.

Allogene Organtransplantationen bringen eine lebenslange Immunsuppression mit zahlreichen Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Infektionen oder Hyperlipidämie mit sich (Parlakpınar & Gunata, 2021). Die regenerative Medizin verschafft sich, durch die Möglichkeit der autologen Transplantation von maßgeschneiderten Produkten, den großen Vorteil auf einen lebenslangen Eingriff in das Immunsystem der Patienten mit

entsprechenden Nebenwirkungen verzichten zu können. Im nächsten Abschnitt werden die Matrices und Zellquellen zur Produktherstellung in der regenerativen Medizin erläutert.

1.2 Matrices und Zellquellen zur Produktherstellung

In der regenerativen Medizin sorgen Matrices für eine dreidimensionale Struktur und bilden so ein der ursprünglichen physiologischen Matrix vergleichbares Produkt. Sie müssen biokompatibel sein, die Ernährung und Adhäsion der Zellen gewährleisten und sich möglichst reizlos in das Gewebe einfügen (Olson et al., 2011).

Man unterscheidet zwischen synthetisch hergestellten und natürlich, biologisch abbaubaren Matrices als Trägerstrukturen. Synthetisch hergestellte Matrices, z.B. Polyethylenterephthalat, besitzen den Vorteil, die Materialeigenschaften wie Halbwertszeit, Festigkeit, Struktur und Permeabilität selber bestimmen zu können (Bakhshandeh et al., 2017). Materialien aus natürlichen Polymeren wie z.B. Kollagen, zellfreie menschliche (allogene) oder tierische (xenogene) Materialien gehören zu den natürlichen, biologisch abbaubaren Matrices. Diese erlauben den Zellen Adhäsion, Proliferation, Migration, Differenzierung, verändern die biomechanischen Eigenschaften und bieten Zellen die Möglichkeit ortsständig ihre eigene Matrix herzustellen (Badylak et al., 1999). Da in der Regel allogene und xenogene Matrices verwendet werden, müssen diese vor der Verwendung dezellularisiert werden. Dies bedeutet eine restlose Entfernung der ursprünglichen Zellen und DNA aus den Matrices (Meezan et al., 1975). Die Struktur und Biomechanik der dezellularisierten Organe/Gewebe bleibt erhalten. Dezellularisierte Scaffolds können als Patch eingesetzt werden. Ahlmann et al. untersuchen die Anwendung dezellularisierter Nabelarterien als gewebe-technologisch hergestelltes Gefäßtransplantat (Ahlmann et al., 2021). Zusätzlich kann das Vorhandensein eines Gefäßsystems zur physiologischen Versorgung der Zelle mit den oben genannten Vorzügen eines biologischen Trägermaterials vereint werden. Ein Beispiel ist die BioVaSc-TERM[®] (Biological Vascularized Scaffold) die aus Schweinejejunum gewonnen wird und in dieser Arbeit als Matrix Anwendung findet.

Im Tissue Engineering können allogene, autologe oder xenogene Zellen zur Produktherstellung verwendet werden. Grundsätzlich werden primäre Zellen, Stammzellen (embryonal, adult), induzierte pluripotente Stammzellen iPS oder Zelllinien

als Zellquellen herangezogen (Olson et al., 2011). In dieser Arbeit wird mit autologen, primären Zellen gearbeitet. Sie werden aus einer Biopsie isoliert, ex-vivo expandiert und anschließend in eine Trägerstruktur, die BioVaSc-TERM[®], zur Herstellung eines Transplantats eingebracht. Primäre Zellen sind oft nur in begrenzter Anzahl verfügbar und zeigen ein eingeschränktes Proliferationspotential (Fodor, 2003). Primäre Zellen besitzen jedoch den großen Vorteil funktionell zu sein, ein geringes tumorigenes Potential zu besitzen und ein niedriges Risiko einer Abstoßungsreaktion zu bergen. Bei den in meiner Arbeit verwendeten autologen, primären Zellen handelt es sich um mikrovaskuläre Endothelzellen. Diese werden aus einer Hautbiopsie von Schweinen der deutschen Landrasse gewonnen.

1.3 Arzneimittel für neuartige Therapien

Die verwendeten Trägerstrukturen fallen i.d.R. unter das Medizinproduktegesetz, da sie keinen pharmakologisch aktiven Wirkstoff enthalten. Sobald diese aber mit Zellen besiedelt werden greift das Arzneimittelgesetz. In diesem Fall enthält das Transplantat einen zellulären „Wirkstoff“ der in den Stoffwechsel des Empfängers eingreift. Für die Anwendung eines Arzneimittels am Menschen gelten in Europa insbesondere die 2001 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) veröffentlichten Regularien der Richtlinie 2001/83/EG des europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel (2001/83/EG). Da es in der regenerativen Medizin und dem Tissue Engineering im Bereich der Implantatherstellung zur stetigen Weiterentwicklung kam, wurde eine neue Produktgruppe, die Arzneimittel für neuartige Therapien oder auch Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP), eingeführt. 2007 erfolgte deshalb eine Anpassung der Richtlinien (Regulation (EC) No. 1394/2007), welche die Rahmenbedingungen für die Entwicklung und Herstellung eines ATMP's beinhalten. Es können verschiedene Untergruppen differenziert werden (Ziegele & Müller, 2012):

- Somatische Zelltherapeutika bestehen aus substanziiell modifizierten Zellen oder Gewebe mit veränderten Eigenschaften, Merkmalen oder Funktionen. Erfüllt ein unbearbeitetes Spendergewebe im Bereich des Empfängers eine andere Aufgabe, gehört es ebenfalls zu den somatischen Zelltherapeutika. Somatische Zelltherapeutika werden vor allem zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt

und wirken durch immunologische, metabolische oder pharmakologische Prozesse.

- Genterapeutika sind biologische Arzneimittel, die aus rekombinanten Nukleinsäuren bestehen oder diese enthalten. Sie werden eingesetzt, um definierte Nukleinsäuresequenzen eines Patienten zu entfernen, zu reparieren, zu ersetzen oder zu regulieren. Indem Genterapeutika in direktem Zusammenhang zu bestimmten Nukleinsäuresequenzen stehen, können sie zur Therapie eingesetzt werden.
- Biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte sind Arzneimittel, die vollständig aus biotechnologisch bearbeiteten Zellen bestehen oder diese besitzen. Sie finden Anwendung zur Wiederherstellung, dem Ersatz oder der Regeneration menschlichen Gewebes. Das Gewebeprodukt erfüllt im Empfängerbereich eine neue Funktion oder wurde substanziiell bearbeitet.
- Kombinierte Arzneimittel für neuartige Therapien beinhalten ein oder mehrere Medizinprodukte und ergänzend die Wirksubstanz in Form von viablen Zellen oder Gewebe. Zell- und Gewebeanteile, die nicht lebensfähig sind, müssen eine Hauptwirkung auf den Patienten erwirken.

Die Zulassung eines ATMP als Arzneimittel muss zentralisiert über die Europäische Arzneimittel-Agentur erfolgen. Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) ist für die Genehmigung der klinischen Prüfung nach § 4b des Arzneimittelgesetzes (AMG) für ATMP's zuständig. Zusätzlich wird eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG nötig, wenn ein Arzneimittel oder ein klinisches Prüfpräparat für Patienten hergestellt wird. Diese erteilt die zuständige Landesbehörde. Eine Einhaltung der Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practise = GMP) wird hier nötig. Die Richtlinien der Guten Herstellungspraxis beinhalten Vorgaben zur Sicherung der Qualität von Abläufen in der Produktion und deren Umgebung zur Herstellung von Wirkstoffen und Arzneimitteln. Das Ziel ist es, den Patienten vor gefährlichen oder bedenklichen Produkten zu bewahren. Im Mittelpunkt der Guten Herstellungspraxis stehen Regularien zu den verwendeten Räumlichkeiten, der Hygiene, dem Personal, den genutzten Geräten, der GMP gerechten Dokumentation und der Qualitätskontrolle.

Da ATMP's komplexe Produkte sind variieren, abhängig von der Produktart, der Eigenschaften der Ausgangsstoffe und der Komplexität des Herstellungsprozesses, die mit ihnen einhergehenden Risiken. Bei ATMP's müssen die zur Einhaltung eines hohen Qualitätsstandards eingesetzten Vorgehen an die Anforderungen des Herstellungsprozesses, limitierte Chargengrößen und die Variabilität der Ausgangsstoffe angepasst werden. Folglich ist es besonders wichtig bei der Festlegung der für ATMP's maßgebenden Anforderungen der Guten Herstellungspraxis einen bestimmten Grad an Flexibilität mit einzubeziehen. Aus diesem Grund tritt durch die Europäische Kommission im Mai 2018 der GMP Leitfadenspezial für ATMP's in Kraft (European Commission, 2017).

In dieser Arbeit ist eine GMP-konforme Herstellung des Endproduktes mit den entsprechend durchgeführten Prozessschritten von großer Bedeutung. Im folgenden Abschnitt wird auf die therapeutische Anwendung dieser Arbeit eingegangen.

1.4 Ursache und Behandlung von Blasendefekten

Das Zusammenspiel der Entleerungs- und Speicherfunktion der Harnblase gewährleistet die Harnkontinenz und bewahrt den oberen Harntrakt vor Schädigungen in Form von Infektionen oder Druck. Durch die Fehlinnervation des unteren Harntraktes bei einer Spina bifida, das Vorhandensein struktureller Fehlbildungen (posteriore Urethralklappen, Blasenektrophie) oder als Folge von strahlentherapeutischen oder chirurgischen Eingriffen bei Tumoren im Blasenbereich entsteht eine niederkapazitive Hochdruckblase (Langer et al., 2019). Diese führt zu einer Druckschädigung des oberen Harntraktes und der Nieren. Die genannten Erkrankungen stellen die häufigsten Ursachen für eine Nierentransplantation im Kindesalter dar. Damit diese Komplikationen vermieden werden können, wird eine Therapie in Form einer intermittierenden Katheterisierung oder eine medikamentöse Behandlung (Botulinumtoxin A und Anticholinergika) durchgeführt (Langer et al., 2019). Wenn diese Methoden jedoch versagen, erfolgt in vielen Fällen eine operative Behandlung zur Rekonstruktion der Blase in Form einer Erweiterungsplastik (Augmentation). Meist wird ein Darmsegment (Enterozystoplastik) für diese Versorgung herangezogen. Die Harnblase wird erweitert, der intravesikale Druck gesenkt und somit der obere Harntrakt entlastet. Die Aufnahme von körperfremden Bestandteilen in den Harntrakt, in Form von Darmgewebe, ist jedoch mit einer erheblichen

Langzeitmorbidity verbunden. Schleimbildung, Harnwegsinfekte, Blasensteine, Elektrolytimbalancen und eine erhöhte Malignitätsrate stellen sowohl eine große Belastung für die Patienten, als auch einen wesentlichen sozioökonomischen Kostenfaktor dar (Obermayr et al., 2011).

Zur Vermeidung dieser Komplikationen wurden unterschiedliche neue Ansätze vom Tissue Engineering zur Rekonstruktion der Blase erarbeitet. Um die Harnblase langfristig und komplikationsarm zu erweitern werden azelluläre oder mit Zellen besiedelte Biomaterialien oder autologer Darm verwendet. Im klinischen Alltag waren diese Ansätze, trotz aussichtsreicher präklinischer Ergebnisse, nicht erfolgreich. Im Langzeitverlauf zeigte sich eine deutliche Bildung von Narben mit Schrumpfung des Augmentates oder eine nur ungenügende Regeneration bei größeren Augmentaten (Caione et al., 2012) (Schaefer et al., 2013). Eine Hauptursache ist die fehlende Durchblutung des implantierten Gewebes und die damit verminderten metabolischen und immunologischen Eigenschaften (Schaefer & Stehr, 2018). Damit die Problematik der Minderperfusion des Augmentats gelöst werden kann, steht eine anastomosierbare Trägerstruktur auf Basis eines dezellularisierten, porcinen Jejunumsegments (BioVaSc-TERM[®]) zur Verfügung. Zur Regeneration vielfältiger Knochendefekte wurde diese vaskularisierte Trägerstruktur bereits in Großtierstudien eingesetzt (Schultheiss et al., 2005).

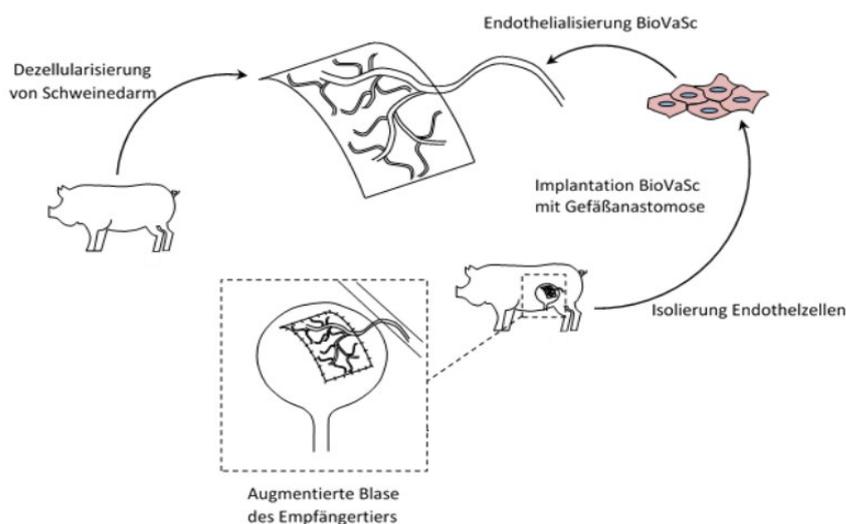


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Zur Herstellung eines Blasenaugmentats (UroVaSc) wird Schweinejejunum unter Erhalt des Gefäßsystems dezellularisiert. Das Gefäßsystem wird anschließend mit Endothelzellen des Empfängertieres besiedelt. Hierdurch wird die Barrierefunktion der Blutgefäße gewährleistet, thrombotische Gefäßverschlüsse, sowie eine host-versus-graft Reaktion vermieden. Das im Bioreaktor endothelialisierte Augmentat wird auf die eröffnete Blase des Empfängertieres genäht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothese

Das Ziel meiner Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung und Qualitätskontrolle eines dreidimensionalen, vaskularisierten Blasenaugmentats zur Rekonstruktion der Blase im Kindesalter.

Die folgenden Experimente beruhen auf der Hypothese, dass mit Hilfe aus einer porcinen Spenderbiopsie isolierte, primäre, mikrovaskuläre Endothelzellen und der Verwendung eines dezellularisierten Jejunumabschnittes mit erhaltenen Gefäßsystemstrukturen als Trägergerüst ein dreidimensionales Blasenaugmentat für den Einsatz am Großtier hergestellt werden kann. Für die Herstellung und Freigabe dieses Blasenaugmentat wird es erforderlich sein, dass die GMP-konformen Freigabekriterien eingehalten werden. Hierfür wurden Protokolloptimierungen durchgeführt.

Im Verlauf meiner Arbeit sind die Methoden der Isolation und Kultivierung der Zellen, die Rebesiedlung und Kultur des autologen Augmentats als auch die Qualitätskontrolle unter den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (GMP) zu etablieren.

Als xenogenes Trägermaterial soll die biologisch, vaskularisierte Matrix (BioVaSc), ein Stück dezellularisiertes Jejunum aus dem Schwein, verwendet werden. Für die aus Spenderhaut isolierten primären Endothelzellen wird ein Isolations- und Kultivierungsprotokoll etabliert. Daran schließt sich die Optimierung der Rebesiedlung der BioVaSc mit den autologen mikrovaskulären Endothelzellen und das Kultivierungsverfahren in einem Bioreaktorsystem unter GMP-Bedingungen.

Die Entwicklung eines solchen Produkts unterliegt strengen regulatorischen Rahmenbedingungen. In dieser Arbeit wurden Qualitätskriterien für die beiden Zwischenprodukte BioVaSc und Endothelzellen, sowie für das Endprodukt die UroVaSc, etabliert. Die UroVaSc definiert ein fertiggestelltes dreidimensionales Blasenaugmentat, eine mit mikrovaskulären Endothelzellen rebesiedelte BioVaSc.

2 Material

Im folgenden Kapitel werden die Materialien aufgelistet, welche zur Durchführung der Experimente benötigt wurden.

2.1 Verwendete porcine Ausgangsgewebe für die UroVaSc

Tabelle 1 Verwendete porcine Ausgangsgewebe, BioVaSc Vorrat

BioVaSc-Lot.-Nr.	Datum Herstellung	Qualität (Phenolrottest)
GMP B71	07.12.2020	2
GMP B74	25.01.2021	3
GMP B86	19.04.2021	3
GMP B90	21.06.2021	3

Tabelle 2 Verwendetes biologisches Material, Hautbiopsien Schweineoperation

Datum der Entnahme	Stamm	Geschlecht	Alter in Wochen	Gewicht in kg	Herkunft	Tiernr.
01.04.2021	DLR	weiblich	14	65,0	Heinsberg ¹	1
15.04.2021	DLR	weiblich	15	70,0	Heinsberg ¹	2
29.04.2021	DLR	weiblich	17	80,0	Heinsberg ¹	3
14.05.2021	DLR	weiblich	19	85,0	Heinsberg ¹	0
25.01.2021	DLR	männlich	9	20,5/19,5	Dettelbach ²	620/621
22.02.2021	DLR	männlich	8	19,5/20,5	Dettelbach ²	512/514
22.03.2021	DLR	männlich	11	19,5/19,5	Dettelbach ²	551/554
19.04.2021	DLR	männlich	8	20,0/20,5	Dettelbach ²	526/524
21.06.2021	DLR	männlich	10	20,0/19,5	Dettelbach ²	621/620

¹ – Heinrichs Tierzucht GmbH, 52525 Heinsberg

² – Schweinezuchtbetrieb K. Niedermeyer, 97337 Dettelbach

2.2 Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 3 Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium/Lösungen/Enzyme	Hersteller	Katalognummer
Anti-Anti (100x)	Gibco®	15240-062
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-048-700
Deoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich	30970-500G
Descosept	Dr. Schumacher	55535
Dispase I	Roche Diagnostics	04942086001
DMSO	Sigma-Aldrich	D4818-100ML
DNase I	Roche	10104159001
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered (PBS ⁻)	Sigma-Aldrich	D8537-500ML
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline With MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered (PBS ⁺)	Sigma-Aldrich	D8662-500ML
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec	130-059-901
FCS	Bio & Sell	FCS.ADD.0500
Gelatine	Serva	22151
Histofix 4 %	Carl Roth®	P087.5
LightCycler 480, Probes Master, H ₂ O	Roche Diagnostics	04707494001
MTT (5 mg/ml)	Serva	20395-04
Phenol Red Solution (0,5 %)	Sigma-Aldrich	P0290-100ML
Trypan Blue Solution	Gibco®	15250061
TrypLE Select (10 x)	Gibco®	A12177-01
Vasculife VEGF Endothelmedium	Lifeline Cell Technologie®	LM-0003
Versene	Gibco®	15040066

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 4 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Citratpuffer 10x, pH 6	42 g Citric acid 1,5 l Millipore-water 5 M NaOH
Deoxycholsäure Natriumsalz Lösung	49,5 g Deoxycholsäure Natriumsalz 1500 ml Demineralisiertes H ₂ O
DNase I Lösung	100 mg DNase I 250 ml PBS ⁺
FACS Puffer	PBS ⁻ 1 % BSA 2mM EDTA
MACS Puffer	PBS ⁻ 0,5 % BSA 2mM EDTA
pH6-Lösung 1:10	Citratpuffer 10x, pH6 Demineralisiertes H ₂ O
Waschpuffer 1:10	Waschpuffer 10x Demineralisiertes H ₂ O
Waschpuffer	PBS ⁻ 0,5 % Tween-20

2.4 Antikörper

Tabelle 5 Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-Alpha Actin	mouse	1:100	Abcam	ab7817
Anti-Vimentin	mouse	1:1000	Abcam	ab8069
Anti-Von Willebrand Faktor	rabbit	1:100	Abcam	ab9378
CD31	rabbit	1:50	Bioss Antibodies	Bs-0195R

Material

CD31 FITC	mouse	1:50	Thermo Fisher	MA5-28344
Collagen I	rabbit	1:100	OriGene	BP8007
Sekundärantikörper	Herkunft		Hersteller	Katalognummer
Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 647	donkey	1:400	Life Technologies	A-31571
Anti-Hase IgG, Alexa Fluor 555	donkey	1:400	Life Technologies	A-31572
Isotyp	Herkunft		Hersteller	Katalognummer
Mouse IgG1 K Iso Control FITC	mouse	1:50	eBioscience	11-4714-42

2.5 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Tabelle 6 Verwendete Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Katalognummer
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme	ALI20R500
BSA	Carl Roth	0163.3
Eosin 1 % wässrig	Morphisto	10177
Ethanol	Carl Roth	K928.4
Entellan®	Sigma-Aldrich	1.07960.0500
Fluoromount-G™ DAPI	Invitrogen	00-4959-52
Hämatoxylin	Morphisto	10231.01000
Histofix 4 %	Carl Roth	P087.3
Isopropanol	Carl Roth	6752.2
Natriumdisulfit 10 %	Morphisto	13108.02500
Paraffin	Carl Roth	6642.6
Peroxidase Block Solution	Dako	S202386-2
Roticlear	Carl Roth	A538.5
Salzsäure (5,0 mol/l)	Morphisto	13533.02500
Schiffs Reagenz	Morphisto	11686.02500

Material

SUPERVision 2 HRP Kit	DCS	PD000KIT
Citric acid	Sigma-Aldrich	W230618
Triton® X-100	Carl Roth	3051.2
Tween®-20	Sigma-Aldrich	P1379-500ML
Waschpuffer 10x	Dako	S3006
Hämatoxylin sauer nach Mayer	Morphisto	10231
Xylol	Carl Roth	9713.3

2.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Labormaterial	Hersteller/Lieferant	Katalognummer
Alufolie	A. Hartenstein, Würzburg	AF50
Cellstar Pipette 5/10/25/50 ml	Greiner Bio-One	606 180
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner Bio-One	188 271
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio-One	227 261
Cryo.s 2 ml	Greiner Bio-One	126279
Dako Pen	Dako	52002
Deckgläser 24 × 60 mm	VWR	17597-Q
Deckgläser ø 12 mm	A.Hartenstein	DKR1
Einbettkassetten	Roth	720-2218
Einmalskalpellklingen	Feather®	02.001.30.022
Filterpapier	R. Langenbrinck	09-0030
Limulus Amebocyte Lysate Test Cartridges 5 - 0,05 EU/ml	Charles River Laboratories	PTS20F
Mikrotomklinge	Feather®	02.075.00.000
MS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-201
Nitril Handschuhe	Hartmann	942 206
Objektträger Polysine	Thermo Fisher	J2800AMNZ

Material

Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck	03-0060
Parafilm	Parafilm	PM-996
Perfusorschlauch	B. Braun	8255172
Perfusorspritze 50 ml	B.Braun	8728810F
Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf	4164889
Pipetten 10-100 µl	Eppendorf	3678967
Pipetten 100-1000 µl	Eppendorf	H29984E
Röhren 5 ml	Sarstedt	55.1579
SafeSeal Tubes 1,5 ml	Sarstedt	72.706
Zellsieb 40 µm	VWR	732-2757
Zellsieb 100 µm	Falcon	352360
Zellkulturflasche 25	TPP	90026
Zellkulturflasche 75	TPP	90076
Zellkulturflasche 150	TPP	90151
Zellkulturschale 100	TPP	93100
Zellkulturschale 150	TPP	93150
24-Well-Platte	TPP	92024
96-Well-Platte	TPP	92097

2.7 Laborgeräte

Tabelle 8 Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Modell
Accu-Jet pro	Brand	12M14864
Bioreaktor Inkubator Wagen	Eigenbau Fraunhofer-ISC	A949000/2014/101100
Corning® Cool Cell LX Cell Freezing Container	Merck	CLS432001
Drahtbügel für Färbegestell	Roth	H553.1
Drucker Einbettkassette	Vogel	VCP5001
Drucker Objektträger	Vogel	VSP5001
Durchflusszytometer	BD Biosciences	BD Accuri C6 Plus

Material

Einbettmaschine	Thermo Fisher	Microm STP 120
Endosafe nexgen-PTS	Charles River Laboratories	PTS150
Feuchtekkammer	Weckert Labortechnik	600016
Färbekasten	Roth	H554.1
Gefrierschrank -20 °C Gefrierschrank -80 °C	Liebherr	84.268.512.0
Glas-Einsatz für Färbekasten	Roth	H552.1
Handzähler	VWR	720-1984
Kühlraum 4 °C	Genheimer, Kälte-Klima- Technik GmbH	
MACS Multistand	Miltenyi Biotec	130-042-303
Messzylinder 100 ml	Roth	C177.2
Messzylinder 1000 ml	Roth	Y575.2
Metall-Einsatz für Färbekasten	Roth	CET8.1
Metallschalen (Gießformen)	Thermo Fisher	6401018
Mikrozentrifuge	Carl Roth	T464.1
Milli-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem	Merck	Z00Q0V0WW
MiniMACS Seperator	Miltenyi Biotec	130-042-102
Perfusor	B. Braun	8713030
Pinsel	Roth	5481.1
Pinzette gebogen spitz	Roth	2856.1
Pinzette gerade stumpf	Roth	2690.1
Schüttler	IKA	ROCKER 2D D 0004003000
Stoppuhr	Oregon Scientific	TR118
TermoStat Plus	Eppendorf	5352 000.010
Trichter	VitaLab	710
Vortex Genie 2	Scientific Industries	G560E

Material

Wärmeschrank 60 °C	MEDITE®	TD066
Wasserbad yellow line	ET basic	ET B
Zählkammer Neubauer	A. Hartenstein	40442702
Zellkultur Inkubator	Thermo Fisher	BBD 6220
Zellkultur Arbeitsbank	Thermo Fisher	Safe 2020
Zentrifuge	Thermo Fisher	Sorvall Legend X1R
Mikroskop, brightfield	Thermo Fisher	EVOS X1
Mikroskop, fluoreszenz	Keyence Corporation	BZ-9000
Mikrotom	Leica Microsystems	SM2010 SR
Vakuum System Pumpe	Vacuubrand	BVC21TN

2.8 Software

Tabelle 9 Verwendete Software

Software	Hersteller
BZ-II Viewer	Keyence Corporation
FlowJo	BD Biosciences
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc
Image J	W. Rasband, National Institute of Health
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft

2.9 Bioreaktortechnik

Tabelle 10 Verwendete Bioreaktortechnik

Reagenz	Hersteller	Modellnummer
Click'n'go CA-Kassette	Ismatec®	IS 3710
Deckel für Planflasche 10 mm	Duran group	21037460
Dichtring 111×3 mm rot	Arcus GmbH	30477

Material

Dichtung mit Teflonbeschichtung GL45 mit Loch	Duran group	2922710
Dichtung mit Teflonbeschichtung GL14 mit Loch	Duran group	2923406
Dichtung ohne Loch für GL32	Duran group	2924818
Druckdome	Memscap	SP84428
Gewindeflasche Klarglas 100 ml GL45	Duran group	2180124
Glasreaktor Planflasche mit Nut, 100 mm	Duran group	21034460
Glasdom	Spezialanfertigung Lenz, Wertheim	
Glasstab gebogen 6 mm	Spezialanfertigung Lenz, Wertheim	
Glasstab gerade 6 mm	Spezialanfertigung Lenz, Wertheim	
Luer Lock männlich	Value Plastik	MTLL230J1A
Luer Lock weiblich	Value Plastik	FTL230J1A
Metall Verschluss	Duran group	2907146
Pumpschlauch 681 mm mit ø 2,9 mm innen	IDEX Wertheim	SC0746
Schraubverschluss rot mit Loch GL45	Duran group	2922710
Schraubverschluss rot ohne Loch GL32	Duran group	2924019
Silikonschlauch ø 3,2 mm, Wandstärke 0,8 mm	Tygon®	SC0760
Sterilfilter	Sartorius AG	16596HY
WILO Schlauchklemme	Bürkle GmbH	YE70.1
Y-Schlauchverbindung	Value Plastik	Y230-J1A

3 Methoden

Im folgenden Kapitel erfolgt eine ausführliche Beschreibung der durchgeführten Experimente. Die Herstellung eines ausgereiften Blasenaugmentats, der UroVaSc, gliedert sich in vier Abschnitte:



3.1 Dezellularisierung des porcinen Jejunums

Vor der Entnahme eines porcinen Jejunumsegments aus dem Spendertier wird das Schwein mit dem Ziel der Antikoagulation heparinisiert. Für diesen Forschungsabschnitt ist eine Berechtigung zur Durchführung von Tierversuchen erforderlich. Ein Antrag wurde gestellt und mit folgender Antragsnummer AZ 55.2-2532-2-256 genehmigt. Nach einer Eingangskontrolle der Transportgefäße wurde das porcine Jejunumsegment über das Lumen und die Arterie luftblasenfrei im Kreislauf des Reaktorsystems befestigt und die Dezellularisierungslösung über die Gefäße und das Lumen zugeführt (Abb. 2). Am arteriellen Zugang wurde der Druck der zulaufenden Lösung erfasst. Damit die Gefäße nicht durch übermäßige Drücke Schaden erleiden, wurde der Druck gleichmäßig kontrolliert. 500 ml Dezellularisierungslösung wurden der BioVaSc über die Gefäße, 250 ml Lösung über das Lumen zugeführt. Die Dezellularisierungslösung floss in einem geschlossenen Kreislauf. Die Regulation der Amplitude ist von großer Wichtigkeit. Diese soll 120 mmHg nicht überschreiten und wurde über die Fließgeschwindigkeit bestimmt. Mit Hilfe der Spülung von 1 l PBS⁻ wurde das Abfließen der bei der Zellyse entstehenden Zellstücke erreicht. Die Amplitude sollte auch hier die 120 mmHg nicht übersteigen. Im Verlauf des Spülvorgangs sollte regelmäßig nach 250 ml Durchfluss das Lumen leicht geknetet werden und die Flüssigkeit im Lumenkreislauf durch frische 250 ml PBS⁻ ersetzt werden. Durch die Lyse und den Abtransport von Blut und Zellen stellte sich das Jejunumsegment weiß dar. Eine vollständige Entfärbung bestätigt makroskopisch eine erfolgreiche Dezellularisierung. Anschließend wurde das Lumen mit der Dezellularisierungslösung gefüllt und über Nacht bei 4° C auf einem Wippschüttler leicht gerüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde die BioVaSc wiederholt in das Reaktorsystem

eingespannt und mit 2 l PBS⁻ gespült. Hierbei gelten die Druckbestimmungen vom Vortag. Um DNA- und RNA- Reste zu entfernen erfolgte eine Inkubation in DNase I-Lösung. Das Lumen des Darms wurde mit dieser gefüllt, die Enden mit einer Klemme verschlossen und der Darm in einem Becher mit 200 ml DNase I- Lösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lumen ausgestrichen, die DNase I-Lösung entfernt und durch 250 ml PBS⁻ ersetzt. Das Lumen wurde 2-3x gespült und die BioVaSc über Nacht bei 2-8 °C geschüttelt (150 M/min). Am nächsten Tag wurden die Gefäße der BioVaSc mit 2 ml 0,1 %iger Phenolrotlösung mit Hilfe einer Pumpe (2 rpm) angespült und mit einem Foto dokumentiert. Jede BioVaSc erhielt eine Qualitätsbewertung von 1 bis 6. Tab. 11 erläutert diese Bewertung.

Tabelle 11 Qualitätsbewertung einer mit Phenolrotlösung angespülten BioVaSc nach der Dezellularisierung

Qualitätsbewertung	Beschreibung
1	Alle Gefäßäste durchspült. Gefäße im Lumen gleichmäßig verästelt. Alle Gefäßverästelungen rot durchspült.
2	Fast alle Gefäße und Verästelungen im Lumen durchspült ($\geq 90\%$). Sehr kleine Bereiche weiß, meist nur Bereiche am Ende der Gefäßverästelung.
3	Einzelne Bereiche der BioVaSc nicht durchspült. Maximal ein Gefäßast im Lumen nicht gefärbt.
4	Nur wenige Gefäßäste im Lumen durchspült. Wenig Verästelung. Gefäße nicht bis zum Ende des Lumens rot gefärbt.
5	Durchspülung im Lumen sehr gering. Rotfärbung nicht bis zum Ende des Lumens.
6	BioVaSc kaum gefärbt ($\leq 10\%$). Kaum Verästelungen im Lumen sichtbar.

Die azellularisierten Matrices mit den Bewertungen 1 und 2 wurden für den nächsten Prozessschritt aufgespart, in dem eine erfolgreich rebesiedelte BioVaSc als Blasenaugmentat in ein Spenderschwein implantiert und an den Blutkreislauf angeschlossen wird. Die Gefäße wurden nach erfolgter Qualitätsbewertung mit 20 ml PBS⁻ mit Hilfe der Pumpe (5 rpm) gewaschen und das Lumen vorsichtig ausgestrichen. Anschließend wurde die BioVaSc in einen Becher mit 200 ml PBS⁻ gegeben und

bei 2- 8 °C geschüttelt (150 M/min). Das PBS⁻ wurde 3x gleichmäßig über den Tag verteilt gewechselt. Die BioVaSc wurde abschließend in einen Becher mit 200 ml frischem PBS⁻ gelegt und über Nacht geschüttelt (2- 8 °C, 150 M/min). Zur Sterilisation wurde die BioVaSc in eine Transportbox mit Kühlakkus (-20 °C) gelegt und zum Sterilisationsservice (BBF Sterilisationsservice GmbH, 71394 Kernen im Remstal) versandt. Die Sterilisierung erfolgte bei 25 kGy durch einen Kobaltstrahler. Vor der Lagerung der BioVaSc bei 4 °C wurde sie in frisches PBS⁻ überführt.

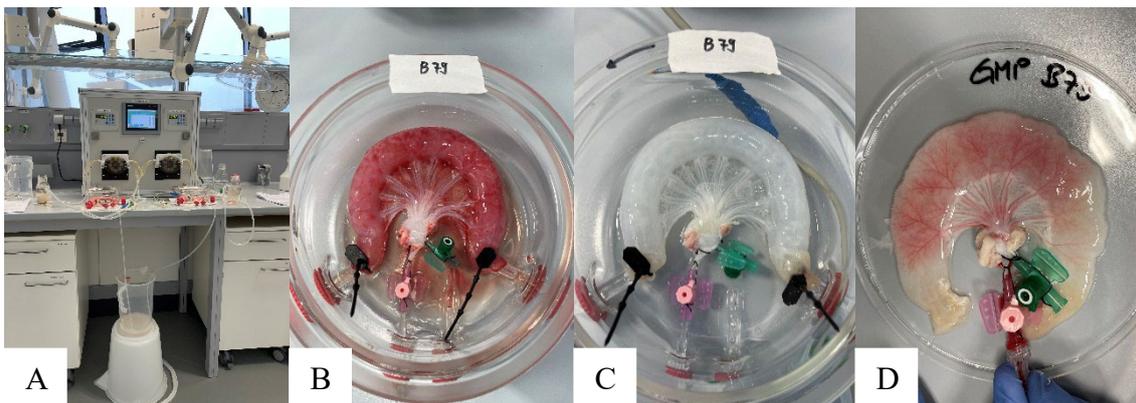


Abbildung 2 Makroskopische Aufnahmen des Azellularisierungsvorgangs im Reinraum. A) Gesamtaufbau des Pumpsystems im Reinraum. B) Das vaskularisierte porcine Jejunum wurde im Reaktorsystem über das Lumen und die Arterie (rot) an den Kreislauf der Reaktorpumpe angeschlossen. C) Das porcine Jejunum wurde vollständig azellularisiert. D) Phenolrotspülung der BioVaSc zur Qualitätsbewertung.

3.2 Zellkultur

Die in meiner Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden in 25 cm², 75 cm² oder 150 cm² Zellkulturflaschen gegeben und in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO² und wassergesättigter Luft kultiviert. Mittels Lichtmikroskopie konnten Zellmorphologie und Dichte der Zellen zwischen den Passagen kontrolliert werden. Alle Labormaterialien wurden vor der Anwendung Autoklaviert oder durch Sterilfilter entkeimt.

3.2.1 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen aus porciner Haut

Die porcinen, primären Endothelzellen wurden aus Hautbiopsien verschiedener operativer Eingriffe isoliert. Die Entnahme der Biopsie erfolgte mit Hilfe einer spindelförmigen Schablone am unteren Bauchbereich des Spendertieres.

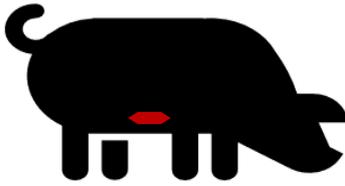


Abbildung 3 Entnahmestelle der Hautbiopsie am Spenderschwein. Eine spindelförmige 14 cm² große Hautbiopsie (rot) wurde am unteren Bauchbereich des Spenderschweins entnommen und in PBS⁻ und 1 % Anti-Anti gelagert.

Die Entwicklung eines schonenden und effektiven Verfahrens zur Entnahme der Hautbiopsie in den Vorversuchen ist für den späteren in vivo Versuch auf Grund des autologen Ansatzes von großer Bedeutung.

Tabelle 12 Entnahmeprotokoll der Hautbiopsie am Spenderschwein

Transportbecher mit Medium 100 ml (PBS ⁻ + 1 % Anti-Anti) aus Styroporbox entnommen.
Hautstelle des Schweins mit Wasser und Seife gewaschen.
Hautdesinfektionsmittel (z. B. Octenisept) angewendet. Einwirkzeit: 1 min.
An der Hautstelle die Borsten abrasiert: Haut glatt gezogen und gleichzeitig mit einem Skalpell die Borsten abgeschnitten bzw. abgekratzt.
Erneut Hautdesinfektionsmittel (z. B. Octenisept) angewendet. Einwirkzeit: 1 min. Falls noch Feuchtigkeit vorhanden, trockengewischt.
Mit Skalpell und Pinzette die Hautbiopsie mit einer Schablone präpariert, dabei Fett vom Muskel (dazwischen Bindegewebe) getrennt. Gewebestück (mit Fett) in den zugehörigen Transportbecher überführt und in die Kühlbox gestellt.

Die Aufarbeitung der Haut erfolgte zunächst am zweiten Tag nach der Entnahme, im Verlauf der Protokolloptimierung am gleichen oder spätestens einen Tag nach der Entnahme. Nachdem die Biopsie aus der Transportdose in eine Petrischale überführt wurde, wurde diese mit PBS⁺ gespült und anschließend vollständig vom Fett befreit. Die Biopsie wurde mit einem Skalpell in 2-3 mm große Streifen geschnitten, um die bakterielle Belastung weiterhin zu reduzieren, erneut mit PBS⁺ gespült und über Nacht bei 4 °C für 15-17 h in 2,4 U/ml Dispase Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Am

nächsten Tag wurde die Dispase Lösung durch PBS⁺ ersetzt und anschließend Dermis und Epidermis mit Hilfe von Pinzetten voneinander getrennt. Die Dermis wurde für 40 min bei 37 °C und 5 % CO₂ enzymatisch mit Trypsin verdaut. Anschließend wurde die Reaktion mit Vasculife VEGF-Medium abgestoppt. Die Epidermis konnte verworfen werden. Die Streifen der Dermis wurden nach dem Verdau in vorgewärmtes Endothelzellmedium überführt und einzeln unter leichtem Druck von jeder Seite 8-10x ausgestrichen. Um Geweberückstände zu entfernen, wurde die Zell-Medium-Suspension durch ein 100 µm Zellsieb gegeben. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 250 g für 10 min bei 20 °C. Die gewonnenen Zellen wurden mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro cm² ausgesät. Um eine Verunreinigung mit Fremdzellen, insbesondere Fibroblasten, zu verhindern, erfolgte in den ersten 4-5 Tagen eine 10- minütige Inkubation mit Versene, ein Waschschrift mit PBS⁺ und ein Medienwechsel. Der Erfolg der Inkubation mit Versene wurde mikroskopisch kontrolliert. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden wurde dem Zellkulturmedium 1 % Anti-Anti zugegeben.

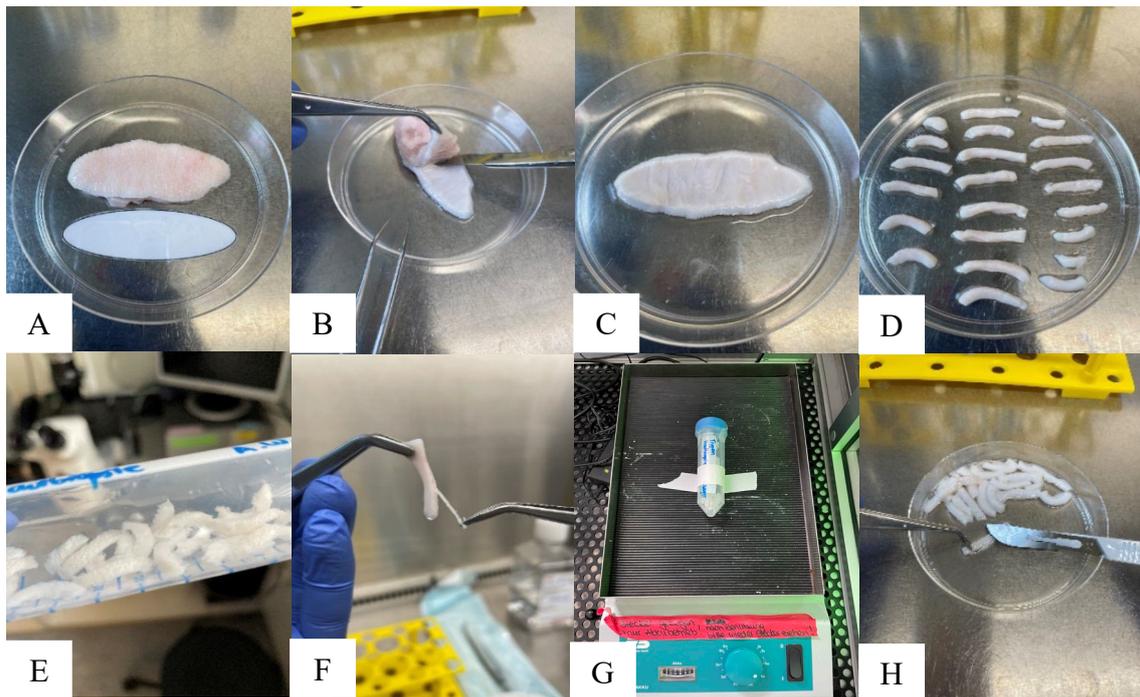


Abbildung 4 Makroskopische Aufnahmen der Aufbereitungsschritte der Schweinehaut zur Endothelzellisolierung. A) Hautbiopsie auf 10 cm² zugeschnitten. B) Präparation der Fettschicht mit einem Skalpell. C) Die Dermis wurde vollständig vom Fett befreit. D) Die Dermis wurde in 2-3 mm breite Stücke geschnitten. E) Dispaseverdau in einem 50 ml Röhren über Nacht bei 7 °C. F) Entfernung der Epidermis von der Dermis mit einer spitzen Pinzette. G) Trypsinverdau der Dermis in einem 50 ml Röhren auf einem Rüttler. H) Sanftes Ausstreichen der Endothelzellen aus Dermis mit einem Skalpell.

Im Verlauf der Vorversuche zeigten sich nach einem erfolgten Medienwechsel zunehmend Adhäsionsprobleme der mikrovaskulären Endothelzellen, kurz mvEC, an den Kulturgefäßoberflächen. Zur Optimierung der Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung der isolierten Primärkultur wurde deshalb im weiteren Verlauf eine Gelatinebeschichtung der Kulturgefäßoberflächen eingesetzt. Zur Gelatinebeschichtung wurden 2 ml / 25 cm² einer sterilen 0,1 %igen Gelatinelösung in die Kulturflasche gegeben und diese für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und die Zellen ausgesät.

3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Auf Grund einer Prozessoptimierung wurden nach erfolgter Biopsieverarbeitung und nach einer einwöchigen Kultivierung die mvEC für nachfolgende Untersuchungen eingefroren. Eine Zelldichte von 1,0-1,5 x 10⁶ Zellen/ml wurde in einem geeigneten Zellkulturmedium, bestehend aus 70 % spezifischem Basismedium, 20 % FCS und 10 % DMSO, eingestellt und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgt nach 24 h im - 80 °C Schrank und im Anschluss in einem Stickstofftank bei -180 °C.

Um die Zellen aufzutauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad (37 °C) geschwenkt, bis nur noch ein stecknadelkopfgroßes Eisklumpchen zurückblieb. Danach wurde die Zellsuspension in das Medium (37 °C) im Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde nach dem Zentrifugieren abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden zwei oder drei T75-Zellkulturflaschen mit 1,0-1,5 x 10⁶ Zellen befüllt und mit vorsichtigem Schwenken in der Zellkulturflasche verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium in der Zellkulturflasche ausgetauscht, um zytotoxische Reste des Dimethylsulfoxid (DMSO) und tote Zellreste zu entfernen.

3.2.3 Aufreinigung der Primärkultur mit Antikörper-gekoppelten Microbeads

Während der Isolierung der mvEC aus der Dermis wurden auch andere unerwünschte Zelltypen isoliert und mit in Kultur gebracht. Um einem Fibroblastenwachstum entgegen zu wirken erfolgte in den ersten 4-5 Tagen eine 10-minütige Inkubation mit Versene. Nach der ersten Subkultivierung der Zellkultur kam es jedoch zu einem Überwachsen unerwünschter Zelltypen, die im Laufe der Kultivierung zu einer starken Mischkultur führten und einem überwiegenden Endothelzellwachstum entgegenwirkten. Um die

Reinheit der Primärkultur zu erhöhen, wurden während der ersten Subkultivierung und ggf. während der zweiten Subkultivierung die mvEC durch Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) angereichert. Die mvEC wurden durch den zelltypischen CD31 Oberflächenmarker, der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert ist, gebunden. Anti-CD31 Microbeads banden anschließend an den Primärantikörper und ermöglichten so eine indirekte magnetische Markierung und Trennung von Zellen. In diesem Fall fiel die Wahl auf eine positive Selektion der mvEC. Positive Selektion bedeutet, dass ein bestimmter Zielzelltyp magnetisch separiert wurde. Während der Trennung blieben die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurück, während unmarkierte Zellen durchgeflossen sind. Nach einem Waschschrift wurde die Säule aus dem Magnetfeld des Separators entfernt, die Zielzellen aus der Säule eluiert und erneut in Kultur gebracht. Um die Aufreinigung der mvEC durchzuführen, wurden diese bei einer Konfluenz von 80 %, entsprechend Abschnitt 3.2.4., aus der Zellkulturflasche abgelöst. Die Endothelzellen wurden vor der Bestimmung der Zellzahl durch ein 40 µm Sieb gegeben, um die Zellen zu vereinzeln und die Bindungsrate des Antikörpers zu erhöhen. Anschließend wurde mit 2 ml MACS Puffer bei 350 g für 3 min gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, in 80 µl MACS Puffer resuspendiert und mit 20 µl Blocking Reagent auf Eis inkubiert. Nach 15 min wurde erneut mit 2 ml MACS Puffer bei 350 g für 3 min gewaschen. Danach wurde in 100 µl Puffer resuspendiert, 10 µl des Primärantikörpers CD31 zugegeben und für 30 min dunkel und auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde mit 2 ml Puffer bei 300 g für 10 min gewaschen, das Pellet in 90 µl MACS Puffer gelöst und mit 25 µl Microbeads bei RT für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein letzter Waschschrift mit 2 ml MACS Puffer bei 300 g für 10 min. Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS Puffer aufgenommen und auf die mit 500 µl Puffer vorgespülte Säule gegeben. Während die Zellen durch die Säule liefen wurde dreimal mit 500 µl Puffer nachgespült. Ist dies erfolgt, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, auf ein frisches Röhrchen gestellt und mit Druck ein Kolben durch die Säule gedrückt. Die aufgefangene Zellsuspension wurde zentrifugiert, die Zellzahl der Positivfraktion ermittelt und anschließend in Kultur gebracht. Um den Erfolg der Aufreinigung bestimmen zu können wurden ca. 50.000 Zellen der Original-, Positiv-, und Negativfraktion entnommen und anschließend für Messungen am Durchflusszytometer vorbereitet. Die Originalfraktion entsprach den Zellen vor der Aufreinigung mit Microbeads, die Positivfraktion den

Zellen, die in der Säule durch das Magnetfeld gehalten wurden, und die Negativfraktion den Zellen, die aufgrund fehlender Markierung durch die Säule hindurchlaufen und in einem Röhrchen gesammelt wurden.

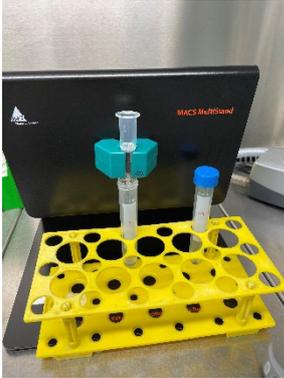


Abbildung 5 Makroskopische Aufnahme der MACS Multistand Säule. 25 ml Positivfraktion- Sammelröhrchen unter der Zellseparationssäule durch einen Magnet befestigt.

3.2.4 Subkultivierung der Zellen

Eine Subkultivierung der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 80 % durchgeführt. Das Medium wurde aus der Flasche abgesaugt, die Zellen mit PBS⁻ gespült und anschließend 1 ml / 25 cm² vorgewärmte Trypsin/EDTA Lösung für 3-5 min hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Ergänzung von Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 250 g, 10 min, 20 °C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und im Anschluss in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Um tote Zellen zu identifizieren wurde Trypanblau verwendet. Tote Zellen sind auf Grund einer defekten Zellmembran permeabel für Trypanblau und färben sich blau an, lebende Zellen erscheinen im Mikroskop weiß. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension (10 µl) im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (10 µl) gemischt und 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen können anschließend in den vier Großquadranten unter dem Lichtmikroskop mit einem Handzähler gezählt werden. Für die Errechnung der Gesamtzellzahl der Lebendzellen wurde folgende Formel verwendet:

$$N = \sum \frac{\text{Zellen}}{\text{gezählte Quadranten}} \times f_{\text{Verdünnung}} \times f_{\text{Kammer}} \times V$$

N steht für die Anzahl der lebenden Zellen und V für das Volumen, in dem die Zellen resuspendiert werden. Der Verdünnungsfaktor ($f_{\text{Verdünnung}} = 2$) errechnet sich aus dem Verhältnis Trypanblau zu Zellsuspension und der Kammerfaktor f_{Kammer} beträgt 10.000.

Die Vitalität wird ausgedrückt in Prozent und ist das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 \%$$

3.2.6 Charakterisierung der Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie

Der Identitätsnachweis der mvEC spielt im Rahmen der Kontrolle der Qualität eine entscheidende Rolle. Für die spätere Augmentation ist es wichtig, die Reinheit der applizierten Zellen nachzuweisen. Hierfür wurde während jeder Subkultivierung der Zellen eine Messung mit einem Durchflusszytometer (Fluorescence-activated-cell-sorting; FACS), um die Endothelzellkultur auf ihre Reinheit zu überprüfen, durchgeführt. Es wurde mit einem BD Accuri C6 plus gearbeitet. Es ermöglicht die Detektion von bis zu 10.000 Ereignissen pro Sekunde. Die Menge des gestreuten Lichtes hängt von Größe und Komplexität der Zellen ab. Im Scatterplot (Forward Scatter; FCS, Side Scatter; SSC) werden die Zellen gated, um Zelldupletten und Zellreste auszuschließen. Anschließend wurde die Autofluoreszenz der Zellen im FITC Kanal (Wellenlänge 530 nm) als FITC⁺ und FITC⁻ definiert. Pro Messung wurden ca. 50.000-100.000 Zellen pro Antikörper, die vorher durch ein 40 µm Zellsieb vereinzelt wurden, von der Zellsuspension der entsprechenden Passage entnommen und mit 1 ml FACS Puffer pro Antikörper bei 350 g für 3 min gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 80 µl Puffer pro AK gelöst und mit 1 µl FcR Blocking Reagent pro AK auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 15 min wurde erneut gewaschen, das Zellpellet in 50 µl Puffer pro AK gelöst und auf die entsprechenden FACS Röhren verteilt. Der Endothelzellantikörper CD31 wurde im Verhältnis 1:100 eingesetzt und entsprechend 0,5 µl zur FACS Röhre dazu gegeben. Entsprechend der Konzentration des Isotyps wurden 0,25 µl in die entsprechende FACS Röhre pipettiert und beide für 30 min dunkel und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 3x mit 1 ml FACS Puffer bei 350 g für 3 min gewaschen und abschließend in 300 µl Puffer für die anstehende Messung resuspendiert. Die für die Messung vorbereiteten Zellen wurden dunkel und auf Eis gelagert und innerhalb von 2 h vermessen. Zum

Vermessen wurde der Rechner hochgefahren und die Software gestartet. Der Laufweg des Samplers wurde überprüft und ist frei. Das Gerät wurde angeschaltet und die Zellen direkt vor der Messung durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 40 µm gegeben. Die Proben wurden auf unterschiedliche Position des Samplers gestellt und im FITC Kanal vermessen.

3.2.7 Charakterisierung der Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz

Zusätzlich zur Bestimmung der Reinheit der Endothelzellkultur mittels Durchflusszytometrie wurden die mvEC mittels Immunfluoreszenz charakterisiert. Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht darauf, dass man Antigene auf/in Zellen mit spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern detektieren und sichtbar machen kann. Die Zellen zum Besiedlungszeitpunkt der BioVaSc wurden mit je 10.000 Zellen / Well in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät und nach fünf Tagen mit 500 µl Histofix 4 % pro Well für 15 min fixiert. Anschließend wurden zelltypspezifische Antikörperfärbungen an den in Wellplatten kultivierten Zellen durchgeführt und diese ausgewertet. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde eine „Sekundärantikörper-Kontrolle“ durchgeführt. Dafür wurden die Zellen ausschließlich mit dem Sekundärantikörper behandelt. Die Belegung und Färbung der Wellplatten erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 13 Schematische Darstellung der Wellplattenbelegung

CD31 + Anti-Alpha Actin Sekundärantikörper Anti-rabbit + Anti-mouse	CD31 Sekundärantikörper Anti-rabbit	Anti-Alpha Actin Sekundärantikörper Anti-mouse	vWF Sekundärantikörper Anti-rabbit
Vimentin Sekundärantikörper Anti-mouse	Kollagen I Sekundärantikörper Anti-rabbit	Sekundärantikörper Anti-mouse	Sekundärantikörper Anti-rabbit

Nachdem die Zellen fixiert und einmal mit 500 µl PBS⁻ pro Well gewaschen wurden, folgte eine zweiminütige Permeabilisierung mit 0,5 % TritonX-100. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden auf einem Schüttler statt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS⁻ und die Zugabe des Blockierserums BSA 5 % um unspezifische Bindungsstellen für das IgG zu blockieren. Nach 1 h wurde das Blockierserum abgenommen und der Primärantikörper hinzugefügt. In alle Kammern wurden 200 µl

Antikörperverdünnungslösung gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 7 °C und geringer Bewegung inkubiert. Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Zellen 3x für 5 min mit einem Waschpuffer aus PBS⁻ und 0,5 % Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:400 bei RT im Dunkeln. Nach 1 h wurde der Sekundärantikörper abgenommen und erneut 3x für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde ein Tropfen Eindeckmedium auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Zelleseite nach unten, ohne Ausbildung von Luftblasen, auf Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am Folgetag unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Auswertung der Endothelzellreinheit wurden jeweils fünf Bilder der Doppelfärbung CD31 und Anti-Alpha Actin in unterschiedlichen Bereichen mit ähnlich dicht besiedelten Bereichen aufgenommen. Von der gefärbten, runden Wellplatte wurde jeweils ein Bild oben und unten links, oben und unten rechts und in der Mitte der Platte nach folgendem Schema aufgenommen:

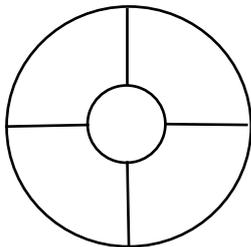


Abbildung 6 Schema zur Lokalisation der fünf Aufnahmebereiche auf einer gefärbten Wellplatte. Das runde Deckglas auf einem Objektträger wird in die Bereiche oben und unten links, oben und unten rechts und in der Mitte aufgeteilt und in jedem Bereich unter dem Mikroskop ein Bild in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Wie viele Zellen sich im jeweiligen Bild befinden wurde mit dem Programm ImageJ ermittelt. Die Anzahl der Zellkerne wurde vom Programm ausgezählt, notiert und mit Hilfe der manuell ausgezählten positiven Anti-Alpha Actin Zellen die Endothelzellmenge indirekt berechnet.

3.3 Herstellung des endothelialisierten Augmentats

Zur Herstellung eines autologen Augmentats wurden die mvEC in die azellularisierte Matrix eingebracht und für zwei Wochen in einem speziell dafür angefertigten

Bioreaktorsystem kultiviert. Für das in dieser Arbeit entwickelte Augmentat wurden mvEC isoliert und anschließend in die vorhandene Gefäßstruktur eingebracht.

3.3.1 Besiedlung und Reifung des Gefäßsystems

Der sterile Bioreaktor wurde unter aseptischen Bedingungen zusammengebaut, mit VEGF-Medium befüllt und die BioVaSc über die Arterie luftblasenfrei angeschlossen. Die BioVaSc wurde über Nacht bei einem Druck von 120 mmHg zu 80 mmHg auf 37 °C erwärmt und äquilibriert. Die Gefäße wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit mvEC besiedelt. Hierfür wurden aus der entsprechenden Anzahl an Flaschen pro Tag mindestens 20×10^6 mvEC geerntet. Die Rebesiedlung der Matrix begann nach dem Einstellen der Zellzahl auf eine Millionen Zellen/ml und dem Verschließen des Lumens mit Hilfe von Klemmen. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Perfusors bei einem Fluss von 60 ml/h in den arteriellen Zugang der in einer Petrischale liegenden BioVaSc injiziert. Anschließend wurde das in der Petrischale befindliche Medium gesammelt und bei 250 g für 5 min zentrifugiert, die enthaltene Zellzahl bestimmt und mit einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml mit Hilfe des Perfusors in den venösen Zugang eingebracht. Der Vorgang des Besiedlungsprozesses wird in Abb. 7 dargestellt:

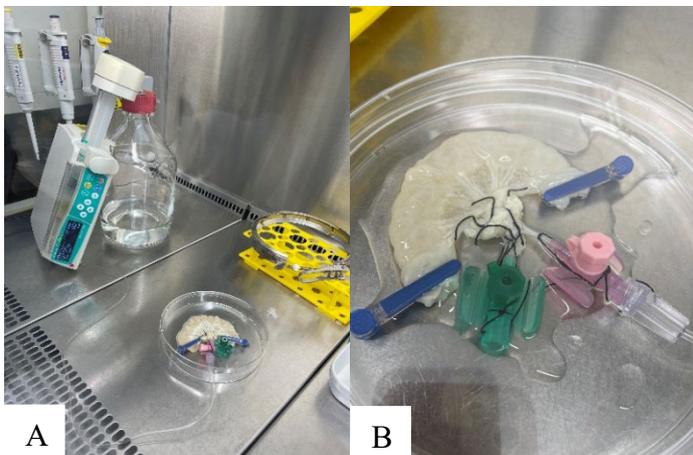


Abbildung 7 Makroskopische Aufnahmen der Besiedlung des Gefäßsystems einer BioVaSc.

A) Einbringen der Endothelzellen in die Gefäße der BioVaSc unter der Sterilbank mit einem Perfusor. B) Die Lumenenden der BioVaSc wurden mit Klemmen verschlossen. Der Endothelzellfluss erfolgt mit mind. 20×10^6 Zellen über die Arterie (rot).

Anschließend wurde die mit Zellen besiedelte BioVaSc in den mit Endothelzellmedium (37 °C) gefüllten Kultivierungsbioreaktor überführt und der pulsatile Druck innerhalb von 8 h von 0-40 mmHg auf 80-120 mmHg erhöht. Die stetige Drucksteigerung diente der langsamen Adaption der mvEC an die physiologischen Drücke ohne sie dabei aus dem

Gefäßsystem auszuspülen. Der Bioreaktor sorgte mit 37 °C, 5 % CO₂ und einem finalen Druck von 120 mmHg zu 80 mmHg für körperähnliche Kultivierungsbedingungen. Um die Besiedlungsdichte mit mvEC zu erhöhen erfolgte am nächsten Tag eine zweite Besiedlung nach den bereits durchgeführten Schritten. Nach der zweiten Besiedlung wurden die Klemmen vom Lumen entfernt damit sich zwischen Serosa und Matrix keine Flüssigkeit sammelt und die Serosa sich nicht ablöst. Während der Kultur erfolgte 2x ein Austausch des gesamten Mediums im Reaktorsystem.

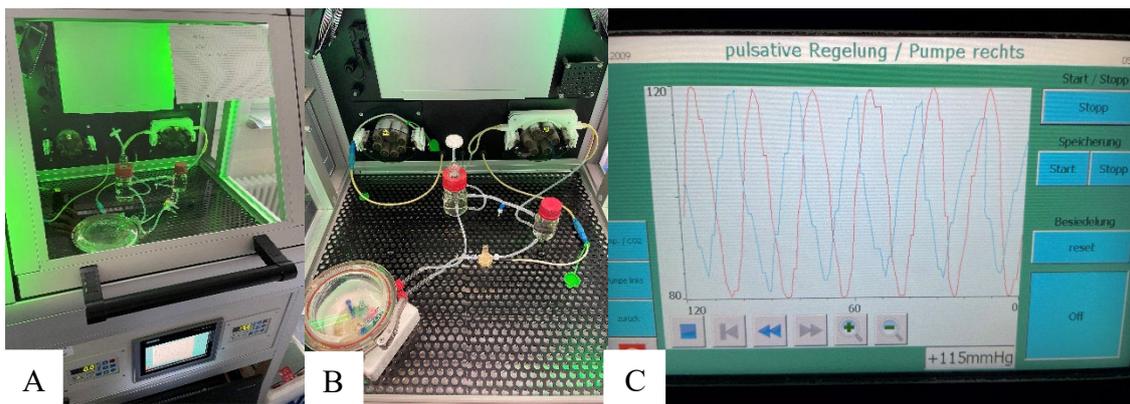


Abbildung 8 Makroskopische Aufnahmen des Inkubatorwagens und Bioreaktorsystems während der Besiedlung einer BioVaSc mit Endothelzellen

A) Speziell angefertigter Inkubatorwagen mit vollständigem Bioreaktorsystem in der Inkubationskammer. B) Gesamtaufbau des Bioreaktorsystems innerhalb der Inkubationskammer mit eingespannter BioVaSc. C) Pulsative Druckregelung in mmHg während der zweiwöchigen Besiedlung. Rot: Sollwertkurve. Blau: Istwertkurve.

3.4 Qualitätskontrolle des endothelialisierten Augmentats

Richtlinien zur Qualitätssicherung von Produktionsabläufen und deren Umgebung sind in der „Good Manufacturing Practice“ beinhaltet. Um direkte Auswirkungen auf die Gesundheit des Patienten durch Abweichungen von diesen Normen vermeiden zu können, muss besonders auf die Qualität geachtet und diese überwacht werden. Neue und sichere Maßnahmen zur Qualitätskontrolle müssen somit für jeden Prozess entwickelt werden. Im europäischen Arzneibuch, der Pharmacopeia, sind eine Vielzahl pharmazeutischer Regeln zur Qualität, Prüfung, Lagerung und Bezeichnung von Arzneimitteln zusammengefasst. Die Herstellung und Prüfung der dazu benötigten Materialien, Stoffe und Methoden wird ebenso beschrieben. Im Rahmen der Entwicklung eines ATMP sind diese möglichst weitgehend zu adaptieren. In meiner Arbeit waren Qualitätskontrollen des autologen Augmentats festzulegen. Dazu gehören die Zellcharakterisierung, verschiedene Färbungen, die Möglichkeit der

Vitalitätsbestimmung und die Ermittlung von enthaltenen Endotoxinen oder Mykoplasmen.

3.4.1 Histologie

Die Histologie beinhaltet die Herstellung von Gewebeschnitten, die Durchführung von Färbungen und die Beurteilung am Mikroskop.

3.4.1.1 Herstellung der Proben

Die fertig besiedelte BioVaSc wurde in kleine Lumen- und Gefäßbereiche mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und für histologische und immunhistologische Untersuchungen in Histofix fixiert. Die Fixierung in Histofix erfolgte für 3 h bei RT. Anschließend wurden die einzelnen besiedelten und fixierten Abschnitte auf Einbettungsfilterpapiere und in Einbettungskassetten gelegt. Das Einbetten wurde unter Verwendung einer Einbettungsstation durchgeführt. Diese führt eine automatisierte Paraffineinbettung nach folgenden Schritten durch:

Tabelle 14 Paraffineinbettung

Lösung	Zeit (h)	Temperatur
Demineralisiertes H ₂ O	1	RT
Ethanol 50 %	1	RT
Ethanol 70 %	1	RT
Ethanol 80 %	1	RT
Ethanol 96 %	1	RT
Isopropanol I	1	RT
Isopropanol II	1	RT
Isopropanol/Xylol 1:1	1	RT
Xylol I	1	RT
Xylol II	1	RT
Paraffin I	3	60 °C
Paraffin II	3	60 °C

Nach der Durchführung des Programms wurden die Kassetten in das warme Paraffin der Blockierstation gegeben, geöffnet und das Präparat entnommen. Das Präparat wurde anschließend auf der Heizplatte mit einem scharfen Skalpell in Stücke geteilt. Die Schnittkante wurde danach in einer mit Paraffin gefüllten Gießform ausgerichtet und möglichst parallel angeordnet fixiert. Bevor die Paraffinblöcke geschnitten wurden müssen diese mindestens für 4 h bei Raumtemperatur abkühlen. Für die H&E-Färbungen, Feulgen Färbungen und die Immunhistologie wurden am Schlittenmikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt und in demineralisiertes Wasser gelegt. Nachdem die Schnitte mit einem Objektträger aufgenommen wurden konnten diese in warmes (50 °C), demineralisiertes Wasser überführt werden. Die Schnitte trockneten im Anschluss bei 37 °C über Nacht.

Für die histologischen Färbungen müssen die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden, um die Bindungsstellen für die Farbstoffe und Antikörper freizulegen. Um das Paraffin zu schmelzen, wurden die Paraffinschnitte bei 60 °C für 1 h inkubiert. Danach wurden die in Tab. 15 aufgeführten Schritte durchgeführt:

Tabelle 15 Entparaffinieren

Lösung	Zeit (min)
Xylol I	10
Xylol II	10
Ethanol 96 %	2
Ethanol 96 %	2
Ethanol 70 %	2
Ethanol 50 %	2
Demineralisiertes H ₂ O	Schwenken, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind

3.4.1.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) ist ein Färbemethode der Histologie, die eine Anfärbung und Darstellung unterschiedlicher Strukturen eines Gewebes ermöglicht. Anionische Strukturen (z.B. Zellkerne) werden durch Hämatoxylin blau dargestellt. Kationische Strukturen (z.B. Extrazellulärmatrix, Zytoplasma) werden durch Eosin rosa

gefärbt. Die Paraffinschnitte wurden zu Beginn entparaffiniert, rehydriert und im Anschluss gefärbt. Abschließend wurden die hergestellten Gewebeschnitte in Entellan eingedeckt.

Tabelle 16 HE-Färbung

Lösung	Zeit (min)
Hämatoxylin	6
Demineralisiertes H ₂ O	leicht fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
Leitungswasser	5
Eosin	6
Demineralisiertes H ₂ O	leicht fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
Ethanol 70 %	2x eintauchen
Ethanol 96 %	2
Isopropanol I	5
Isopropanol II	5
Xylol I	5
Xylol II	5

3.4.1.3 Feulgen Färbung

Die DNA-Färbung nach Feulgen bietet die Möglichkeit Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in histologischen Schnitten anzufärben und darzustellen. Um die Bindung zwischen der Desoxyribose und den Basen zu lösen findet anfangs eine saure Hydrolyse statt. Die freiwerdenden endständigen Aldehydgruppen interagieren mit der Schiffs Reagenz durch die Bildung des rosa-roten Farbstoffes. Dieser kann anschließend am Mikroskop ausgewertet werden. Der Färbeprozess begann mit dem Entparaffinieren der Proben und den in Tab. 17 aufgeführten Färbeschritten. Im Anschluss der Färbung wurden die Proben in Entellan eingedeckt.

Tabelle 17 Feulgen Färbung

Prozess	Zeit (min)
Leitungswasser	10
Salzsäure (22 °C)	50
Demineralisiertes H ₂ O	2
Demineralisiertes H ₂ O	2
Schiffs Reagenz	60 (dunkel)
Natriumdisulfit-Waschlösung	3
Natriumdisulfit-Waschlösung	3
Demineralisiertes H ₂ O	2
Demineralisiertes H ₂ O	2
Ethanol 50 %	1
Ethanol 70 %	1
Ethanol 80 %	1
Ethanol 99 %	1
Xylol	1

3.4.1.4 Immunhistologie

Für die Immunhistologie wurden die histologischen Schnitte, wie in Tab. 15 aufgeführt, entparaffiniert und dehydriert. Im Anschluss erfolgte eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung in Citratpuffer (pH 6,0) für 20 min bei 95-100 °C in einem Dampfgarer. Danach wurden die Präparate mit einem Fettstift umkreist und vom demineralisierten Wasser in den Waschlösung getaucht. Tab. 18 beschreibt das weitere Vorgehen der Immunhistologie.

Tabelle 18 Immunhistologie

Prozess	Zeit (min)
50 µl Peroxidase-Block pro Abschnitt	5
Waschlösung	5
100 µl Primärantikörper pro Abschnitt	60
3x Waschlösung	2

Methoden

1-2 Tropfen HRP-Enhancer (gelb) pro Abschnitt	20
3x Waschpuffer	2
1-2 Tropfen HRP-Polymer (rot) pro Abschnitt	20
3x Waschpuffer	2
DAB-Lösung auftropfen, Braunfärbung beobachten	2
Demineralisiertes H ₂ O	5
Hämatoxylin	1
Bläuen unter fließendem Leitungswasser	2
Ethanol 99 %	2
Ethanol 99 %	2
Xylol I	2
Xylol II	2

Nach der Färbung erfolgte das Eindecken mit Entellan. Eine Positiv- und Negativkontrolle dienen zur Überprüfung der Färbung. In diesem Fall handelt es sich um ein Präparat Schweinejejunum und SISser.

3.4.1.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die histologischen Schnitte, wie in Tab. 15 beschrieben, entparaffiniert und dehydriert. Im Anschluss erfolgte eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung in Citratpuffer (pH 6,0) für 20 min bei 100 °C in einem Dampfgarer. Danach wurden die Präparate mit einem Fettstift umkreist und vom demineralisierten Wasser in den Waschpuffer getaucht. Tab. 19 beschreibt die Schritte der Immunfluoreszenzfärbung.

Tabelle 19 Immunfluoreszenz

Prozess	Zeit (min)
Blockierlösung	30
Primärantikörper auf Blockierlösung	Über Nacht bei 4°C
3x Waschpuffer	5

Sekundärantikörper in Antikörperverdünnungslösung	120 bei RT
3x Waschpuffer	5

Der Sekundärantikörper wurde lichtgeschützt aufgetragen und die mit Fluoromount DAPI eingedeckelten Schnitte dunkel und bei RT getrocknet und gelagert. Damit unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden können, wurden Negativkontrollen durchgeführt. An Stelle der Zugabe von Primärantikörper wurde den Schnitten nur die Blockierlösung zugegeben.

3.4.2 Bestimmung des Gallsäuregehalts

Um porcine Zellen aus der Matrix zu entfernen wurde Natrium-Desoxycholat verwendet. Die Zellen wurden durch diese Gallensäure lysiert und anschließend durch verschiedene Waschschrte entfernt. Die Rebesiedlung der Matrix mit mvEC kann durch Rückstände der Azellularisierungsdetergenz behindert werden. Der Erfolg des Auswaschens ist deshalb mit einem Inhouse etablierten photometrischen Messverfahren zu kontrollieren.

3.4.3 Nachweis der Zellviabilität mit MTT

Mit Hilfe von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2- μ l)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) kann die Viabilität der mvEC in der Matrix nach zwei Wochen Kultivierungsdauer überprüft werden. Das Prinzip beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2- μ l)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Positive Zellen können anschließend in der Matrix blau-violett detektiert werden. Für diesen Test wurde das MTT-Reagenz mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt und im VEGF-Medium gelöst. Ein Teil der Matrix wurde von der UroVaSc mit einem Skalpell entfernt, die MTT-Lösung über die Gefäßanschlüsse infundiert und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Färbung beurteilt werden.

3.4.4 Bestimmung des Endotoxingehalts

Gramnegative Bakterien besitzen an ihrer äußeren Zellmembran Lipopolysaccharide, sogenannte Endotoxine. Diese können verschiedene Signalwege aktivieren, welche zu Entzündungen oder Apoptose führen können. Des Weiteren können sie Fieber erzeugen. Für die Durchführung des Endotoxintests kommt am häufigsten der Limulus-

Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) zum Einsatz. Zur Durchführung des Tests stehen, wie in der Pharmacopeiae beschrieben, verschiedene Methoden wie das Gel-Clot-Verfahren, das kinetisch-turbidimetrische Verfahren und das kinetisch-chromogene Verfahren, zur Verfügung. In diesem Fall ist die kinetisch-chromogene Methode verwendet worden. Durch das Vorhandensein von Endotoxin kommt es zur Entstehung einer gelben Farbe. Dies lässt sich auf die enzymatische Reaktion zwischen Endotoxin und Lysat zurück führen. Es besteht ein direkter Zusammenhang von Endotoxinmenge und der Intensität der Farbentstehung. Verwendet wurde das Endosafe nexgen- PTS von Charles River Laboratories, das entsprechend die Farbintensivität in Abhängigkeit der Endotoxin-Konzentration in der Probe misst. PTS Kartuschen besitzen jeweils vier Kanäle. Jede Kartusche enthält somit genaue Mengen des LAL-Reagenzes, chromogenen Substrats und Kontrollen, die für schnelle und genaue Ergebnisse erforderlich sind. Die Kartuschen führen automatisch eine doppelte Proben- und Positivproduktkontrolle durch. Es wurde mit einer Verdünnung von 1:10 gearbeitet. Pro Kanal wurden luftblasenfrei 25 µl Flüssigkeit pipettiert und der zulässige Grenzwert bei 1,0 EU/ml festgelegt.

3.4.5 Nachweis von Mykoplasmenkontamination

Bei Mykoplasmen handelt es sich um kommensalisch oder parasitisch lebende Bakterien. Ein besonderes Merkmal der Mykoplasmen ist ihre geringe Größe und das Fehlen einer Zellwand. Antibiotika die Zellwände angreifen sind bei Mykoplasmen wirkungslos. Mykoplasmen passen sich ideal an ihre Wirte an und finden unter Zellkulturbedingungen (37 °C) optimale Wachstumsbedingungen vor. Das Vorhandensein von Mykoplasmen kann Ergebnisse verfälschen und sich auf das Wachstum von Zellen auswirken. Im schlimmsten Fall kommt es zum Totalverlust der Zellkultur (Young et al., 2010). Aus diesem Grund wird eine Untersuchung von Zellkulturen auf Mykoplasmenbefall behördlich gefordert und ist Freigaberelevant für ein Produkt. Diese Problematik gefährdet bei einer anschließenden Anwendung am Patient seine Sicherheit. Mit dem Mycoplasma Detection Kit von der Firma Minerva biolabs lässt sich Mycoplasma-DNA zuverlässig im Zellkulturüberstand nachweisen. Dafür sollten die Zellen 80-90 % konfluent sein. Für eine Mykoplasmenprobe wurde 500 µl Zellkulturüberstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gut verschlossen. Dieses wurde anschließend 10 min bei 95 °C inkubiert um die Mykoplasmen zu lysieren und DNasen zu inaktivieren. Die Probe wurde kurz auf Eis gestellt und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

4 Ergebnisse

4.1 Entnahme der Hautbiopsie

Um mit primären Endothelzellen arbeiten zu können müssen diese vorher aus der Dermis einer Hautbiopsie eines Spenders isoliert werden. Die porcinen, primären Endothelzellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden aus Hautbiopsien verschiedener operativer Eingriffe von Schweinen der deutscher Landrasse isoliert. An welcher Stelle des Spenderschweins und in welcher Form und Größe die Hautbiopsie entnommen werden soll, wurde im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet.

4.1.1 Schablonenentwicklung

Die Form und Größe der Schablone, um eine Hautbiopsie zu entnehmen, sollte dem Spenderschwein eine gute Heilung durch spannungsfreie Wundrandadaption, aber auch eine ausreichende Endothelzellausbeute für die spätere Herstellung des Produkts ermöglichen.

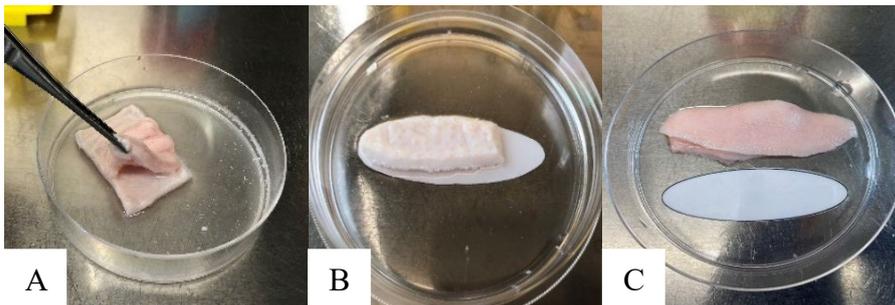


Abbildung 9 Makroskopische Aufnahmen des Fortschritts der Schablonenherstellung.

A) Rechteckige Hautbiopsie mit 10 cm^2 . B) Spindelförmige Hautbiopsie auf einer 10 cm^2 Schablone. Durch den spannungsfreien Zustand erreicht die Biopsie nach der Präparation am Schwein mit einer 10 cm^2 Schablone nicht mehr die geforderten 10 cm^2 . C) Eine 10 cm^2 Hautbiopsie im spannungsfreien Zustand wurde mit einer 14 cm^2 Schablone präpariert.

Das Herstellungsprotokoll fordert eine Biopsatgröße von 10 cm^2 um ausreichend mvEC in Kultur zu bringen. Aufgrund einiger Vorversuche stellte sich heraus, dass die Hautbiopsie nach der Entnahme mit einer 10 cm^2 Schablone an Spannung verliert und entsprechend schrumpft. Um im spannungsfreien Zustand eine 10 cm^2 Hautbiopsie präparieren zu können wurde die Größe der Schablone, der Schrumpfung entsprechend, auf 14 cm^2 vergrößert. Die Form der Schablone wurde ebenfalls angepasst. Zu Beginn wurde dem Spendertier eine rechteckige Biopsie entnommen. Um die Wunde spannungsfrei mit entsprechender Nahttechnik verschließen zu können, wurde ein

spindelförmiges Hautbiopsat bevorzugt. Die Spindel darf nicht zu dünn sein um die Biopsie im weiteren Verlauf in 2-3 mm dicke Streifen schneiden zu können, darf jedoch auch nicht zu dick sein, um die Wunde am Spendertier ausreichend spannungsfrei vernähen und eine gute Wundheilung ermöglichen zu können.

4.1.2 Spenderregion der Hautbiopsie

Ein wichtiger Faktor, um sich für eine geeignete Entnahmestelle der Hautbiopsie am Spendertier zu entscheiden, ist die Heilung der Wunde. Das Spenderschwein sollte die Entnahmestelle nicht berühren können, damit die Wunde in Ruhe und ohne externe Irritationen ausheilen kann. Des weiteren muss die entnommene Biopsie gut zu verarbeiten sein und ausreichend mvEC zur Isolation besitzen. Anhand von drei Hautbiopsien unterschiedlicher Spenderschweine wurde der Entnahmeort am Ohr und Bauch verglichen. Die Ohrbiopsie lies sich schlechter verarbeiten, da die zu entfernende Fettschicht schwieriger und nicht im Ganzen abzupräparieren war. Außerdem besaß die Ohrbiopsie eine dünnere Dermis als die Biopsie vom Bauch, wodurch der Übergang von der Dermis zur angrenzenden Fettschicht schwieriger zu erkennen war. Aus der Biopsie vom Bauchbereich konnten mit maximal $0,82 \times 10^6$ Zellen/ml ($SD = 0,17$) fast doppelt so viele mvEC aus der Dermis isoliert werden als aus der Biopsie des Ohrbereichs mit maximal $0,48 \times 10^6$ Zellen/ml ($SD = 0,18$). Ein t-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % ergab, dass die Differenz der Zellausbeute am Ohr und Bauch nicht signifikant war ($p = 0,06$).

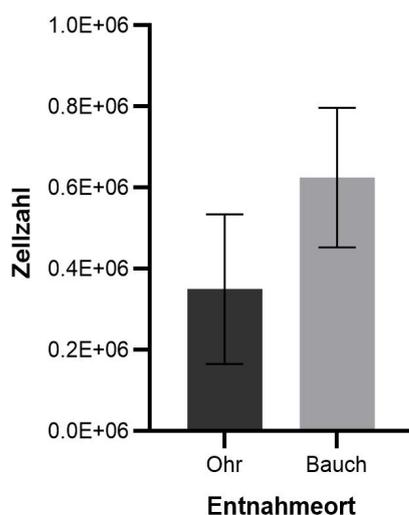


Abbildung 10 Zellzahl der isolierten Endothelzellen zum Vergleich der Entnahmeorte am Spenderschwein. Die Endothelzellausbeute wurde zwischen den Entnahmeorten Ohr und Bauch vom Spenderschwein verglichen (n=3).

Aufgrund der besseren Verarbeitung und Endothelzellausbeute wurden alle nachfolgenden Experimente mit Hautbiopsien vom Bauchbereich durchgeführt.

4.2 Herstellung und Kultivierung der primären Endothelzellkultur

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellausbeute, dem Isolationszeitpunkt der Endothelzellen aus der Spenderhaut und der Expansionsprozess der Zellkultur genauer erläutert.

4.2.1 Zellausbeute

Ziel der Endothelzellkultivierung ist es eine BioVaSc mit mind. 40×10^6 viablen Endothelzellen besiedeln zu können. Im Verlauf der Experimente hat sich gezeigt, dass die Menge der Zellausbeute aus verschiedenen Spenderbiopsien stark variiert (Abb. 11).

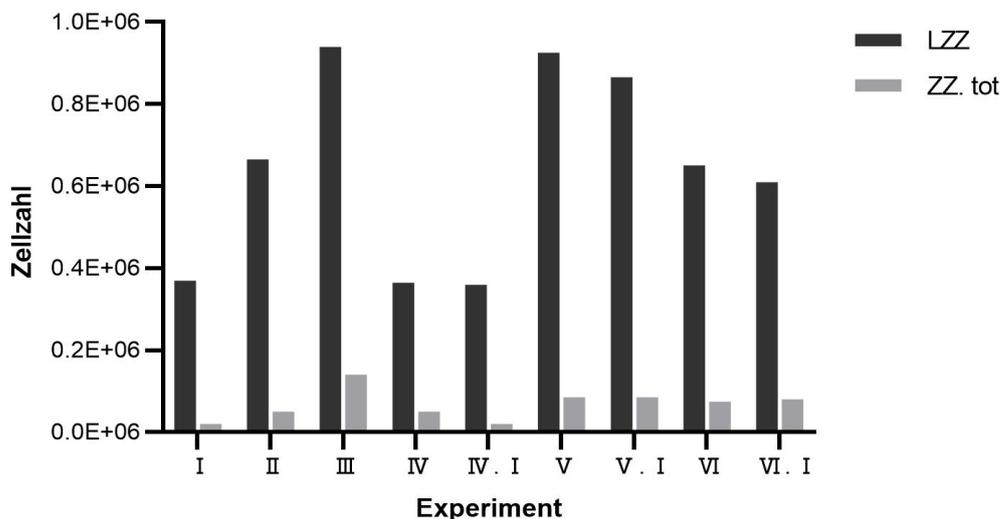


Abbildung 11 Zellzahl und Vitalität der isolierten Endothelzellen aus Hautbiopsien unterschiedlicher Spenderschweine.

In den Experimenten IV, V und VI wurden jeweils zwei Hautbiopsien vom gleichen Schwein entnommen. LZZ = Lebendzellzahl, ZZ. tot = Zellzahl tot.

Die Lebendzellausbeute aller Experimente lag zwischen $0,36 \times 10^6$ und $0,94 \times 10^6$ Zellen/ml ($n=9$, $SD=0,24$). In den Experimenten IV, V und VI wurden jeweils zwei Hautbiopsien vom gleichen Schwein entnommen. Die Standardabweichungen dieser drei Experimente bei der Entnahme von zwei Hautbiopsien/Schwein lagen bei 0,01, 0,04 und 0,03 ($n=2$). Deutlich zu sehen ist, dass die Zellausbeute aus Hautbiopsien verschiedener Spendertiere sehr stark variiert, die Zellzahl der beiden Hautbiopsien vom gleichen Schwein bei allen der drei Experimente annähernd gleiche Endothelzellmengen ergab.

4.2.2 Isolationszeitpunkt

Anhand verschiedener Vorversuche wurde erforscht wie die Menge der Endothelzellausbeute von der zeitlich unterschiedlichen Aufbereitung der entnommenen Biopsie abhängt. Untersucht wurde die Aufbereitung der Schweinehaut am gleichen Tag, einen, zwei und drei Tage nach der Operation. Die Vorgehensweise der Hautaufbereitung erfolgte bei jedem der Experimente nach SOP und wurde nicht verändert. Aus der Hautbiopsie der ersten Operation konnten $0,93 \times 10^6$ Zellen am Tag der Operation isoliert werden. Die zweite Biopsie dieser Operation wurde drei Tage später verarbeitet und ergab $0,32 \times 10^6$ Zellen. Folglich konnten drei Tage später nur weniger als die Hälfte der Menge an Zellen im Vergleich zur Aufbereitung am Operationstag gewonnen werden. Bei der zweiten Operation ergab die Aufbereitung der Haut eine Menge von $0,67 \times 10^6$ Zellen. Die Zellisolation der anderen Biopsie lieferte zwei Tage nach der Operation $0,36 \times 10^6$ Zellen. Zwei Tage später konnten ungefähr die Hälfte der Zellen von der Aufbereitung am Operationstag gewonnen werden. Ähnlich war es bei der dritten Operation mit $0,94 \times 10^6$ Zellen am Entnahmetag und $0,48 \times 10^6$ Zellen zwei Tage später. Auch hier konnte noch die Hälfte der Zellzahl am zweiten Tag erreicht werden. Die vierte Operation ergab $0,65 \times 10^6$ Zellen am Operationstag und $0,57 \times 10^6$ Zellen einen Tag später. Hier fand nur noch eine sehr geringe Abweichung der gewonnenen Zellzahlen zwischen den beiden Tagen statt (Abb. 12).

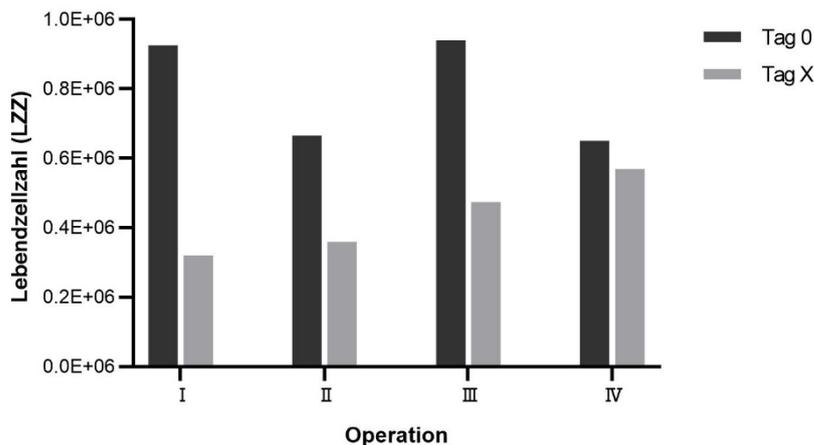


Abbildung 12 Vergleich der Lebendzellausbeute aus entnommenen Hautbiopsien mit unterschiedlichen Lagerzeiten. Pro Operation wurden zwei Biopsien entnommen. Tag 0 entspricht einer direkten Verarbeitung der Biopsie und wurde bei jeder Operation an einer Biopsie durchgeführt. Tag X entspricht, entsprechend der Lagerzeit, den Verarbeitungstag 1,2 oder 3 nach erfolgter Operation. Operation I: Lagerzeit von 3 Tagen. Operation II und III: Lagerzeit von 2 Tagen. Operation IV: Lagerzeit von 1 Tag.

Auch die Menge der isolierten toten Zellen wurde untersucht und ein ähnlicher Verlauf konnte festgestellt werden. Bei einer Aufbereitung der Hautbiopsie drei Tage nach der Operation konnten mehr als doppelt so viele tote Zellen im Vergleich zur Isolation am Operationstag gezählt werden. Eine Aufbereitung zwei Tage und einen Tag nach der Operation weist ungefähr die gleiche Menge an toten Zellen im Vergleich zum Entnahmetag auf (Abb. 13).

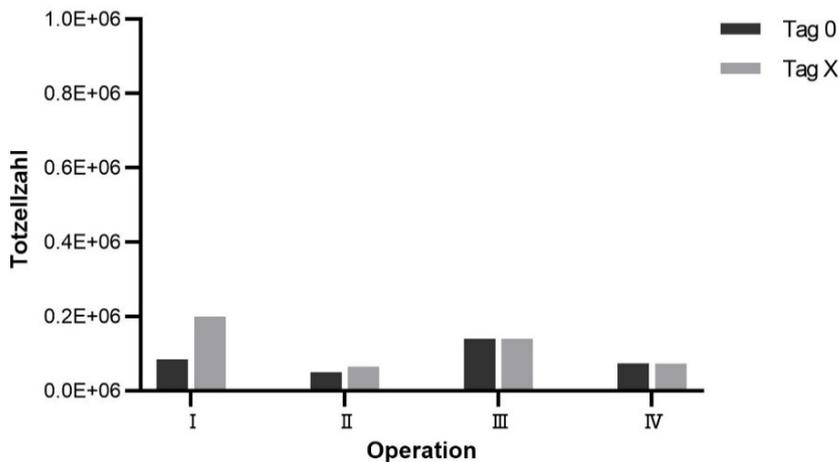


Abbildung 13 Vergleich der Totzellausbeute aus entnommenen Hautbiopsien mit unterschiedlichen Lagerzeiten. Pro Operation wurden zwei Biopsien entnommen. Tag 0 entspricht einer direkten Verarbeitung der Biopsie und wurde bei jeder Operation an einer Biopsie durchgeführt. Tag X entspricht, entsprechend der Lagerzeit, den Verarbeitungstag 1, 2 oder 3 nach erfolgter Operation. Operation I: Lagerzeit von 3 Tagen. Operation II und III: Lagerzeit von 2 Tagen. Operation IV: Lagerzeit von 1 Tag.

Für alle nachfolgenden Experimente wurde, aufgrund der deutlich besseren Zellausbeute bei allen der vier Vorversuche, eine Aufbereitung der Spenderhaut am gleichen Tag der Schweineoperation gewählt. Da die Differenz der Zellausbeute bei einer Isolation am selben Tag der Operation oder einen Tag später nur sehr gering war, wäre auch am Tag nach der Entnahme eine Aufbereitung der Biopsie möglich.

4.2.3 Expansion der Zellen

Um für eine Besiedlung einer BioVaSc ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben, müssen die isolierten primären Endothelzellen in Kultur gebracht und vermehrt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses Prozessschrittes erläutert.

4.2.3.1 Problemstellung Mischkultur

Während der Isolierung der mvEC aus der Dermis wurden auch andere Zelltypen isoliert und mit in Kultur gebracht. Nach der ersten Subkultivierung der Zellkultur kam es zu

einem Überwachsen dieser unerwünschten Zelltypen. In den meisten Vorversuchen wurden die mvEC vollständig überwachsen. In Abb. 14 ist dieser Prozess sehr gut zu erkennen. In Abb. 14 A sind vereinzelte Endothelzellinseln neben andersartigen Zellen zu erkennen. In Abb. 14 B wurden die Endothelzellinseln nach der ersten Subkultivierung innerhalb einer Woche vollständig überwachsen.

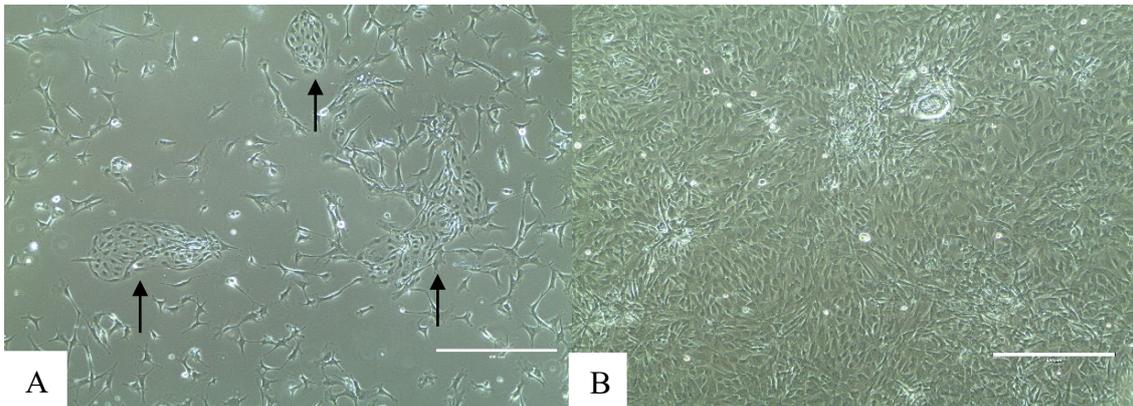


Abbildung 14 Mikroskopische Aufnahmen einer Mischkultur aus Endothelzellen und Zellen vom myofibroblastären Typ zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

A) Endothelzellinseln sind von myofibroblastären Zellen umgeben (Passage 1, Tag 5). Die Pfeile verdeutlichen die Endothelzellinseln. B) Vollständiges Überwachsen der Zellen vom myofibroblastären Typ. Die Endothelzellinseln sind nicht mehr zu erkennen (Passage 1, Tag 11). Die Maßstabsbalken entsprechen 400 μm .

Um die vorhandenen Zelltypen besser differenzieren zu können wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf mit Zellen besiedelten Wellplatten durchgeführt.

4.2.3.2 Aufreinigung der Primärkultur mit Microbeads

Um die Primärkultur aufzureinigen wurde die Anwendung einer säulenbasierten magnetischen Zellisolierung mit Microbeads gewählt. Da während der Aufarbeitung der Spenderbiopsie ein 40-minütiger Trypsinverdau zur Anwendung kommt stellt dies einen Störfaktor für den Zeitpunkt der MACS Anwendung dar. Die enzymatische Behandlung mit Trypsin hat Einfluss auf das Vorhandensein und somit auch auf die Nachweisbarkeit der endothelialen Oberflächenmarker. Da der Primärantikörper zur MACS Aufreinigung mit dem Oberflächenmarker CD31 gekoppelt ist, schließt sich eine Aufreinigung direkt nach der Endothelzellisolation aus der Spenderbiopsie an. Diese Feststellung bestätigt Abb. 15 mit dem Ergebnis der Durchflusszytometriemessung der frisch isolierten Zellen aus einer Spenderbiopsie:

Ergebnisse

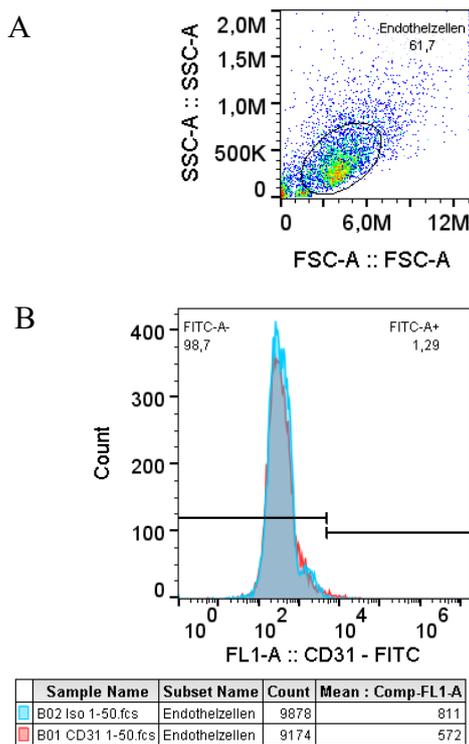


Abbildung 15 Durchflusszytometrische Analyse der primären Endothelzellen aus einer Hautbiopsie, Passage 0. A) Anzahl vitaler Zellen in der Population. Diese wurden durch den FSC / SSC gegatet. B) Anzahl der CD31-positiven Zellen (FITC-A⁺) im FITC Kanal. Blau: Messung des Isotyp. Rot: Messung der Endothelzellen gegen CD31.

Abb. 15 B zeigt, dass auf nur 1,29 % der gewonnenen mvEC nach der Isolation aus einer Hautbiopsie des Spenderschweins und damit verbundener langer Trypsinierung kein Oberflächenmarker CD31 erkannt und gebunden werden konnte. Die primären mvEC aus der Dermis des Spendertiers wurden somit in Kultur gebracht und eine Woche expandiert. Anschließend fand bei allen weiteren Experimenten die magnetische Zellisolierung mit Microbeads während der ersten und ggf. zweiten Subkultivierung statt. Abb. 15 zeigt den mikroskopischen Erfolg einer MACS Aufreinigung anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen und Immunfluoreszenzfärbungen. Für die Identifizierung der Zellen mittels Immunfluoreszenz wurde eine Doppelfärbung mit den Antikörpern CD31 (rot) für die Endothelzellen und Anti-Alpha Actin (grün) für die unerwünschten Zellen vom myofibroblastärem Typ angewendet. Der Erfolg jeder Aufreinigung der primären mvEC wurde optisch anhand der Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop und mittels Durchflusszytometrie Messungen bestimmt. Nicht bei jeder Aufreinigung konnte der Erfolg zusätzlich mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt werden, da die

Ausbeute der Zellzahl der Positivfraktion meist sehr gering war und somit nur eine FACS Messung ermöglicht hat.

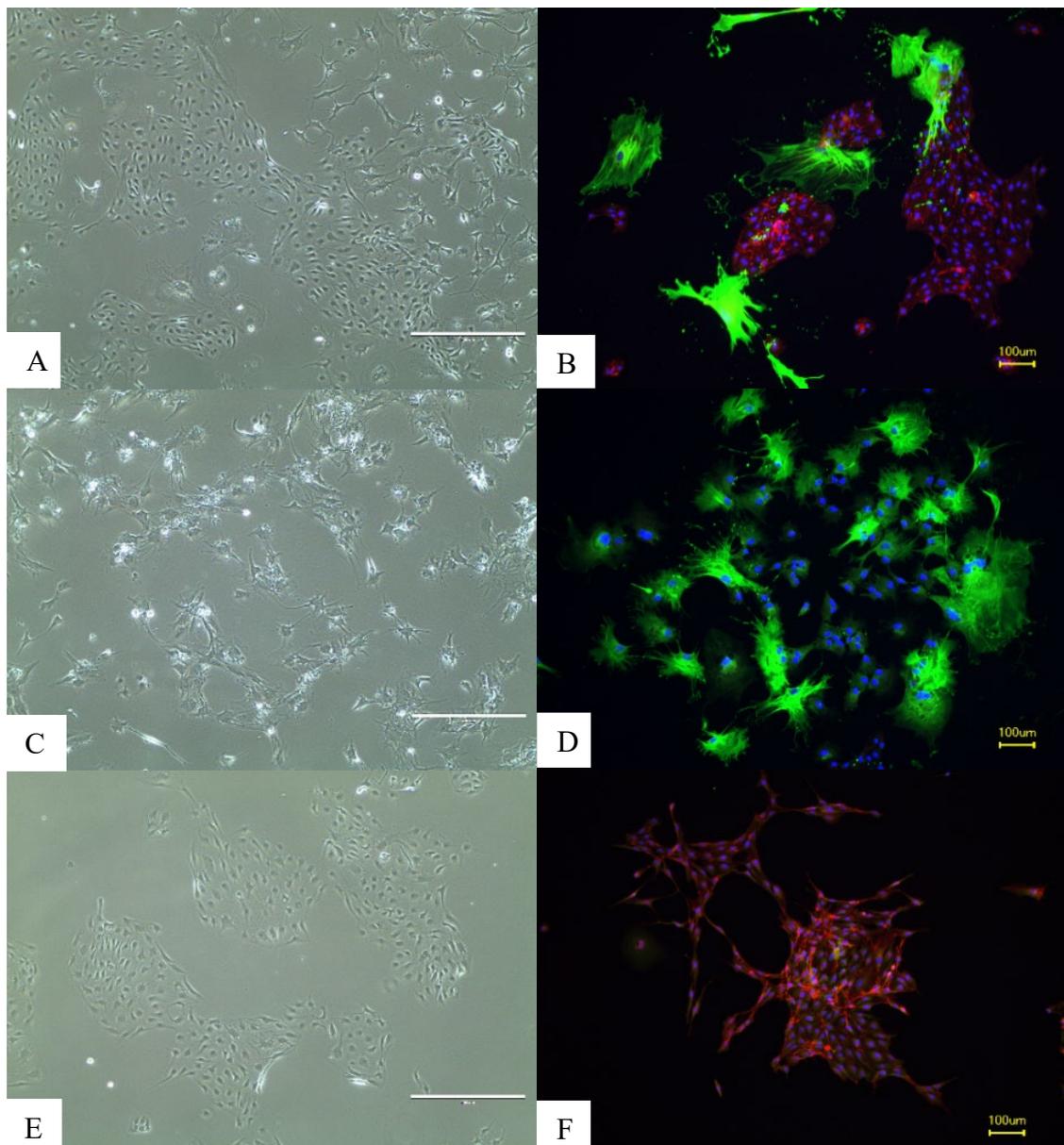


Abbildung 16 Reinheitskontrolle der Endothelzellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung mit Microbeads.

A, C und E zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellkultur. B, D und F stellen lichtmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD31 (rot) und Anti-Alpha Actin (grün) dar. A und B zeigen die Originalfraktion der Zellkultur vor einer Microbeads-Aufreinigung, C und D die Negativfraktion nach erfolgter Aufreinigung und E und F die Positivfraktion, die in Zellkulturflaschen für eine BioVaSc-Besiedlung weiter in Kultur gebracht werden. Zellkerne werden mit DAPI (blau) dargestellt. Die Maßstabsbalken der Aufnahmen A, C und E entsprechen 400 μm , die der IF Aufnahmen B, D und F entsprechen 100 μm .

Um den Erfolg und die Reinheit der Zellkultur überprüfen zu können wurde vor und nach der Aufreinigung eine Zellprobe für eine Durchflusszytometriemessung entnommen.

Ergebnisse

Insgesamt wurden für die Besiedlung von vier BioVaSc primäre mvEC kultiviert. Im ersten Experiment wurde keine Aufreinigung der Endothelzellen durchgeführt, da es während dieser Expansionsphase nicht zu einem Überwachsen der Endothelzellen kam. Dieses Ergebnis konnte in keinem der weiteren Experimente bestätigt werden, weshalb in den weiteren Versuchen die Aufreinigung mit Microbeads erfolgte. Im zweiten und dritten Experiment wurden die mvEC für spätere Versuche nach einer einwöchigen Kultivierung kryokonserviert. Nach dem Auftauen dieser mvEC wurde ein MACS Schritt während der zweiten Passage durchgeführt. Im dritten Experiment wurde nach dem Auftauen der mvEC während der zweiten und dritten Passage aufgereinigt. Um zu bestätigen, dass die Endothelzellen trotz der beiden magnetischen Aufreinigungen und zahlreichen Medienwechsel ihre Adhäsionseigenschaften weiterhin beibehalten, wurde im vierten Experiment erneut zweimal aufgereinigt. Diesmal während der ersten und zweiten Passage. Der Erfolg einer magnetischen Aufreinigung wird exemplarisch in Abb. 17 dargestellt:

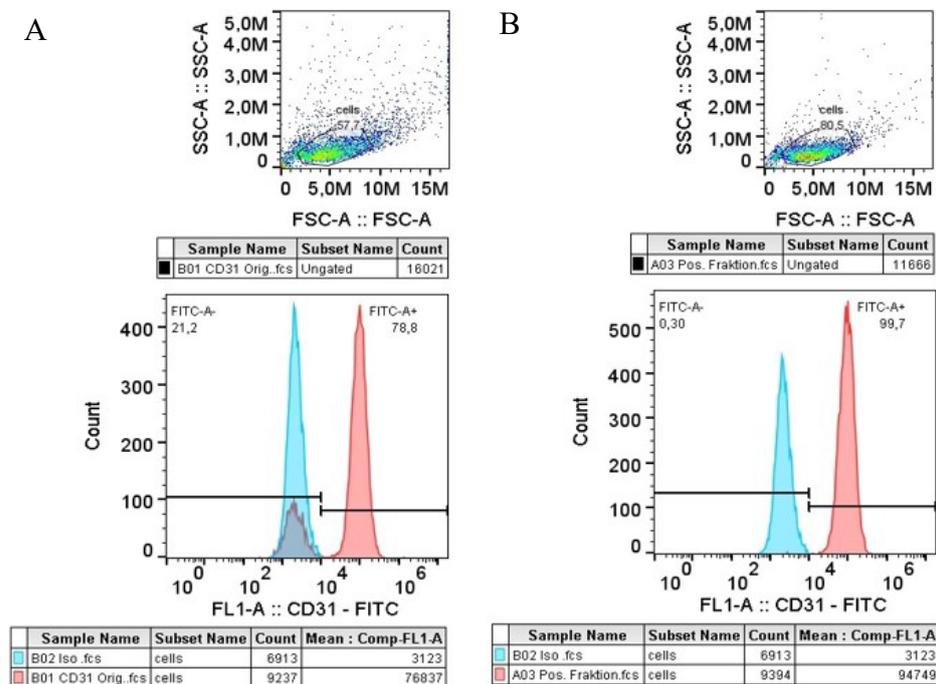


Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse der Endothelzellkultur vor und nach einer Microbeads-Aufreinigung gegen CD31, Passage 1.

A) Anzahl der CD31-positiven Zellen der Originalfraktion (FITC-A⁺ entspricht 78,8 %) im FITC Kanal. B) Anzahl der CD31-positiven Zellen der Positivfraktion (FITC-A⁺ entspricht 99,7 %) im FITC Kanal. Blau: Messung des Isotyp. Rot: Messung der Endothelzellen gegen CD31.

Abb. 17 A stellt die Originalfraktion da. Die vermessene Zellprobe enthielt vor der magnetischen Aufreinigung 78,8 % mvEC und 21,2% Zelltypen, die CD31 negativ sind. Nachdem die Aufreinigung mit Microbeads durchgeführt wurde, konnte in der Positivfraktion 99,7 % mvEC nachgewiesen werden. Die genauen Ergebnisse der einzelnen FACS Messungen werden im Kapitel 4.3.2 ausführlich erläutert.

4.2.3.3 Einfluss einer Gelatinebeschichtung der Kulturgefäße

Die isolierten mvEC wurden in Zellkulturflaschen über mehrere Wochen kultiviert und für die anschließende Besiedlung einer BioVaSc expandiert. Im Verlauf der Kultivierung und damit verbundenen Subkultivierungen in größere Kulturgefäße und Medienwechseln wurden Adhäsionsprobleme festgestellt. Nach einem erfolgten Medienwechsel haben sich die Endothelzellinseln vom Boden des Kulturgefäßes zirkulär aufgerollt und abgelöst.

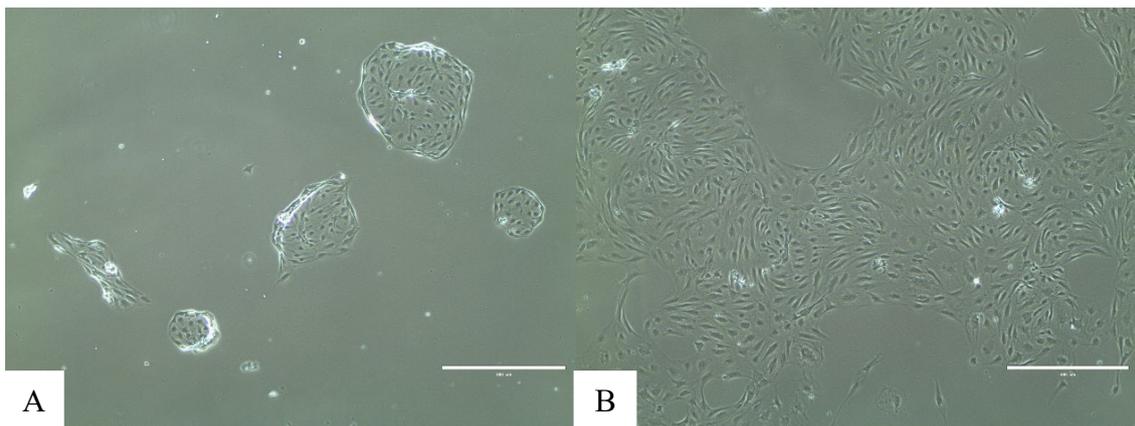


Abbildung 18 Makroskopische Aufnahmen der Endothelzellen in Kultur, Passage 2.

A) Adhäsionsprobleme der Endothelzellinseln. Zirkuläres Aufrollen und Ablösen der Endothelzellinseln vom Zellkulturflaschenboden. B) Endothelzellen in einer Zellkulturflasche mit Gelatinebasis. Gleichmäßiges Wachstum und kein Ablösen der Endothelzellen vom Zellkulturflaschenboden. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 μm .

Unter diesen Umständen war eine erfolgreiche Expansion der mvEC nicht möglich. Um die Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung der isolierten Primärkultur zu optimieren wurde deshalb im weiteren Verlauf eine Gelatinebeschichtung der Kulturgefäßoberflächen eingesetzt. Mit einer solchen Beschichtung konnten in den folgenden Experimenten keine Adhäsionsprobleme beobachtet werden. Des weiteren konnte durch die bessere Adhäsion der Zellen am Kulturgefäßboden auch eine bessere Adhäsion zwischen den Zellen mit einer damit verbundenen zeitlich schnelleren Expansion der Kultur beobachtet werden.

4.2.3.4 Wachstumsverhalten der Endothelzellen

Es wurden insgesamt vier Endothelzellkulturen für BioVaSc Besiedlungen expandiert. Der Zeitraum der Kultivierungsdauer erstreckt sich von 34 bis 45 Tagen, je nach Häufigkeit der magnetischen Aufreinigung und Zwischenschritt der Kryokonservierung. Abb. 19 zeigt den Verlauf der Lebendzellzahl der mvEC der vier erfolgten Besiedlungsexperimente:

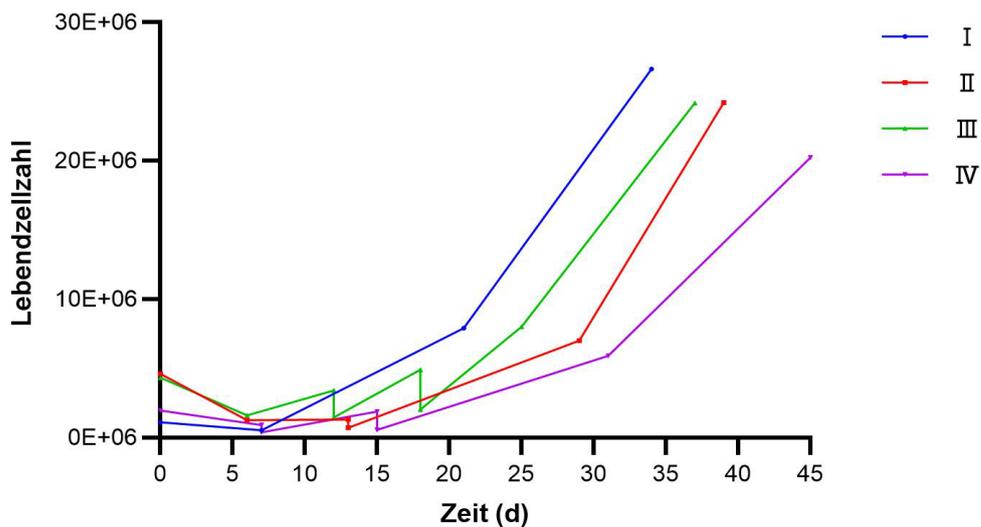


Abbildung 19 Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahlen der Endothelzellkulturen in den Besiedlungsexperimenten I, II, III und IV über eine maximale Dauer von 45 Tagen. Die Einbrüche im Verlauf der Kultivierung der Endothelzellen entstehen durch die magnetischen Aufreinigungen mit Microbeads während den Subkultivierungen.

Die Besiedlungsexperimente ähneln sich im Verlauf. Während der ersten Subkultivierung kam es zu einem Abfall der Zellzahl im Vergleich zur isolierten Zellmenge aus der Spenderbiopsie. Von da an kam es stetig zu einer Zunahme der Endothelzellmenge. Die Einbrüche im Verlauf sind auf die magnetischen Aufreinigungen mit Microbeads während verschiedener Subkultivierungen zurückzuführen. Zur Besiedlung der BioVaSc konnten zwischen $20,24 \times 10^6$ und $26,63 \times 10^6$ mvEC verwendet werden.

4.3 Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen

In der Qualitätskontrolle spielt der Identitätsnachweis der Zellen eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurde die Identität der mvEC mittels Morphologie, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung bestimmt.

4.3.1 Morphologie

Die Lichtmikroskopie hat den Vorteil, dass lebende Zellen nichtinvasiv untersucht werden können. Während der Expansion der Endothelzellkultur konnte die Morphologie der Zellen mit Hilfe der Lichtmikroskopie regelmäßig überprüft werden. MvEC besitzen eine stark abgeflachte, polygonale Form und sind 0,1 – 1 μm flach und 10 – 25 μm breit. Sie verbinden sich untereinander durch Desmosomen und Tight Junctions und sind durch ein klonales Wachstum zu identifizieren. Beim Erreichen der Konfluenz bilden die Zellen einen dichten Monolayer mit pflastersteinartigem Aussehen. Andere vorkommende Zellarten wie Fibroblasten und Zellen vom myofibroblastärem Typ, waren anfänglich optisch schwer von den mvEC zu differenzieren. Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigten die Fibroblasten eine lang gezogene Morphologie mit Ausläufern, sogenannten Mikrospiques, die für die Adhäsion und den Zell-Zell-Kontakt untereinander verantwortlich sind. Sie besitzen einen ovalen Zelleib und sehen durch die zytoplasmatischen Fortsätze häufig sternförmig aus. Fibroblasten weisen eine Größe bis zu 50 μm auf. Zellen vom myofibroblastärem Zelltyp sind nicht einer bestimmten Zelllinie zuzuordnen und werden histologisch zwischen den Fibroblasten und den glatten Muskelzellen eingeordnet. Myofibroblasten sind große, längliche, spindel-, oft sternförmige Zellen und besitzen einen eingedellten Zellkern. Sie enthalten kontraktile Aktin- und Myosinfilamente. Anhand der optischen Charakterisierung der Zellen konnten erste Erkenntnisse über die gewünschte Reinheit der mvEC im Verlauf der Kultivierung gewonnen werden. Durch die sequentielle Behandlung mit Versene direkt nach der Zellisolierung aus der Schweinehaut konnte ein Fibroblastenwachstum verhindert werden. In Abb. 20 werden Bereiche mit vereinzelt wachsenden Fibroblasten gezeigt, welche nach einer 5-minütigen Versene Behandlung aus dem Kulturgefäß entfernt werden konnten.

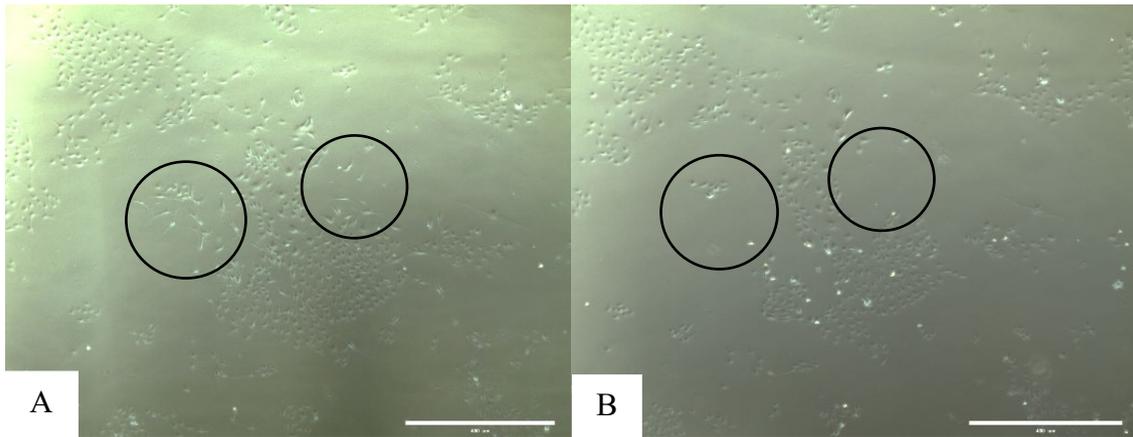


Abbildung 20 Mikroskopische Aufnahmen der Erfolgskontrolle einer Versenebehandlung der Endothelzellkultur, Passage 1.

A) Endothelzellinseln mit Fibroblastenkontamination. B) Erfolgreiche 5-minütige Versenebehandlung. Die Fibroblasten wurden aus dem Kulturgefäß entfernt. In den schwarzen Kreisen ist der Vorher-Nachher-Erfolg der Fibroblasteneliminierung eindeutig zu erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 µm.

Ein sehr dominantes Wachstum der Myofibroblasten konnte optisch im Lichtmikroskop nach der ersten Subkultivierung erkannt werden. Ohne eine magnetische Aufreinigung der Zellkultur wurden die mvEC innerhalb von ein bis zwei Wochen Kultivierungsdauer überwachsen. Nach erfolgter Aufreinigung konnte wieder ein einheitlicheres pflastersteinartiges Wachstum der mvEC mit entstehendem Monolayer erreicht werden. Diese Ergebnisse wurden im Folgenden mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz bestätigt.

4.3.2 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde das Oberflächenantigen CD31 der mvEC mit einem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern markiert und die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz jedes Partikels gemessen. Der verwendete Antikörper war ein FITC gekoppelter Antikörper. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der FACS Messungen der vier Besiedlungsexperimente während unterschiedlicher Subkultivierungen. Ziel war die Bestimmung und Kontrolle der Reinheit der Endothelzellkultur über die gesamte Kultivierungszeit.

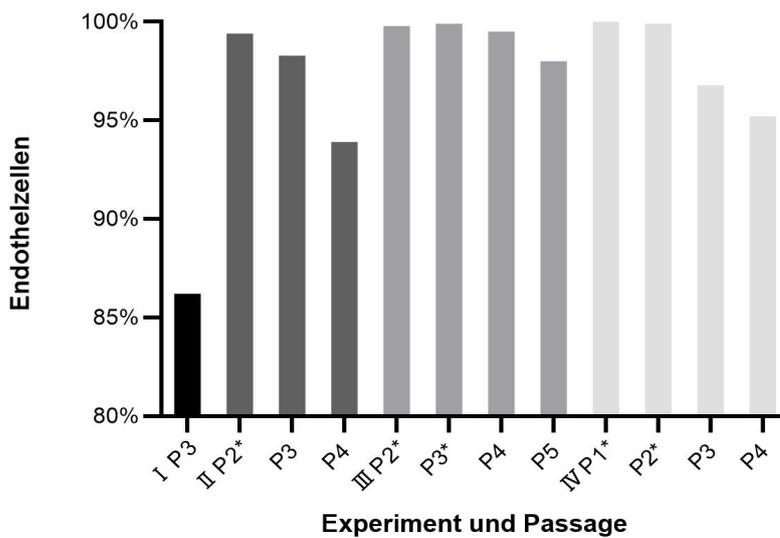


Abbildung 21 Reinheitsbestimmung (in %) der Endothelzellkultur der Besiedlungsexperimente I, II, III und IV mittels Durchflusszytometrie während verschiedener Subkultivierungen.
P = Passage, * = MACS Aufreinigung während der Subkultivierung

Im ersten Besiedlungsexperiment wurde nur die finale Passage im FACS gemessen. Da in diesem Experiment keine MACS Aufreinigung angewendet wurde zeigt dieses auch die geringste finale Endothelzellreinheit aller vier Experimente mit 86,2 %. Die Entwicklung der prozentualen Reinheit der Zellkultur über die Kultivierungsdauer ist bei den drei weiteren Experimenten auf den ersten Blick sehr ähnlich. Es kam zu einer stetigen Minderung der Reinheit mit zunehmender Subkultivierung. Experiment II weist mit einem MACS Schritt eine deutlich bessere finale Reinheit mit 93,9 % auf als das erste Experiment. Durch einen zusätzlichen zweiten MACS Schritt konnte in den Experimenten III und IV eine weitere Reinheitssteigerung auf 98,0 % und 95,2 % für die nachfolgende Besiedlung einer BioVaSc erzielt werden. Des weiteren wurde mit jeder erfolgten MACS Aufreinigung eine Reinheit von mindestens 99,0 % in der jeweiligen Passage erreicht. Daraus lässt sich schließen, dass eine kleine Menge an Fremdzellen ($\leq 1\%$) ausreichend ist, um im weiteren Kultivierungsverlauf die Reinheit der Zellkultur, beispielhaft im Experiment I von 99,4 % auf finale 93,9 %, zu mindern. Aus diesem Grund wurde mindestens ein, besser ein zweiter MACS Aufreinigung-Schritt während der Endothelzellkultivierung in das Protokoll eingeführt.

4.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Um das Ergebnis der Durchflusszytometriemessung der finalen Passage vor der Besiedlung einer BioVaSc zu bestätigen wurde bei allen vier Besiedlungsexperimenten eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt und der prozentuale Endothelzellanteil bestimmt. Abb. 22 veranschaulicht dieses Ergebnis.

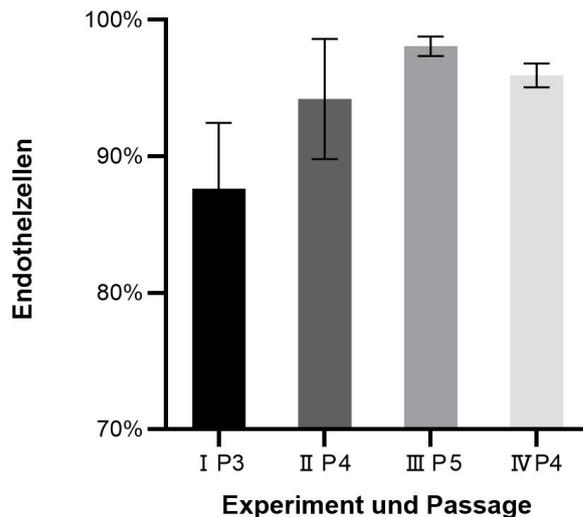


Abbildung 22 Reinheitsbestimmung (in %) der finalen Passage der Endothelzellkultur vor einer BioVaSc Besiedlung. Die Reinheit der Endothelzellkultur wurde in den Besiedlungsexperimenten I, II, III und IV mittels einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 und Anti-Alpha Actin bestimmt. P = Passage, n = 5

Auch mit dieser Methode bestätigt sich der Anteil der mvEC in den finalen Passagen der einzelnen Experimente. Im ersten Experiment ohne eine MACS Aufreinigung wurde der niedrigste Endothelzellgehalt von 87,6 % ($SD = 4,84$) ermittelt. Experiment II mit einer magnetischen Aufreinigung enthält 94,2 % ($SD = 4,39$) mvEC. Experiment III und IV erreichen auf Grund von zwei MACS Schritten die höchsten Endothelzellanteile mit 98,1 % ($SD = 0,71$) und 95,9 % ($SD = 0,88$). Es lässt sich eine gute Korrelation der ermittelten Werte der Immunfluoreszenzfärbung mit den Werten der Durchflusszytometriemessungen erkennen. Abb. 23 zeigt exemplarisch fünf Immunfluoreszenzaufnahmen die in Besiedlungsexperiment I ausgewertet wurden. Zu erkennen sind mvEC in Inseln (rot) umgeben von vereinzelt Myofibroblasten (grün) mit deutlich erkennbaren Aktinfilamenten.

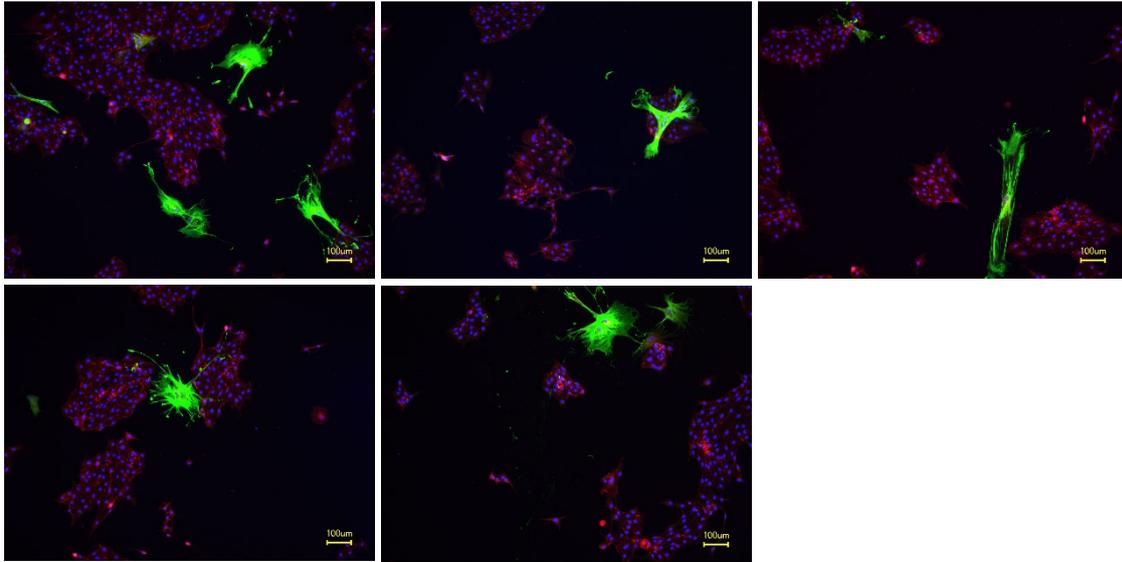


Abbildung 23 Mikroskopische Aufnahmen zur Reinheitsbestimmung der finalen Endothelzellpassage des ersten Besiedlungsexperiments mittels einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 (rot) und Anti-Alpha Actin (grün). CD31 stellt die Endothelzellen, Anti-Alpha Actin die Myofibroblasten dar. Zellkerne werden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

Eine weitere Positivkontrolle, die das Vorhandensein der Endothelzellen bestätigte, war die Färbung gegen vWF. Färbungen gegen Kollagen I weisen das Vorhandensein von Fibroblasten nach. Diese Färbungen ergaben stets Ergebnisse von $<10\%$.

4.4 Herstellung des autologen Blasenaugmentats

Es wurden insgesamt 18 porcine Dünndarmsegmente dezellularisiert. Von diesen wurden sieben mit einer Qualitätsbewertung 1 oder 2 und fünf mit einer 3 bewertet. In dieser Arbeit wurden vier BioVaSc mit einer Bewertung von 2 oder 3 mit primären, porcinen mvEC rebesiedelt und kultiviert, um ein möglichst geschlossenes Gefäßsystem wiederherzustellen.

4.4.1 Besiedlung des Gefäßsystems

Besonders wichtig war eine möglichst vollständige Besiedlung der Kapillarstrukturen. Mit Hilfe eines Perfusors wurden die mvEC mit konstanter Geschwindigkeit über den arteriellen und venösen Anschluss in die BioVaSc infundiert. Es verblieben nicht alle Zellen in der BioVaSc. Die im Medium zurückgebliebenen Zellen wurden gezählt und stellen den Zellverlust während einer Besiedlung dar. Dieser Verlust betrug nur $5,61\%$ ($n = 4$, $SD = 0,74$) der Ausgangsmenge der mvEC. Neben einem geringen Zellverlust ist auch die Ausgangsmenge der mvEC für eine vollständige Besiedlung der

Kapillarstrukturen wichtig. Für eine vollständige Besiedlung einer BioVaSc müssen mindestens 40×10^6 Zellen in 14-17 großen Zellkulturgefäßen (150 cm^2) gewonnen werden. Bei ungerader Anzahl der Zellkulturgefäße wurde am ersten Besiedlungstag mit einer Zellkulturflasche mehr besiedelt. Dies begründet die etwas höhere Zellzahl von $23,82 \times 10^6$ Zellen ($n=4$, $SD=2,64$) am ersten im Vergleich zu $23,15 \times 10^6$ Zellen ($n=4$, $SD=1,87$) am zweiten Besiedlungstag.

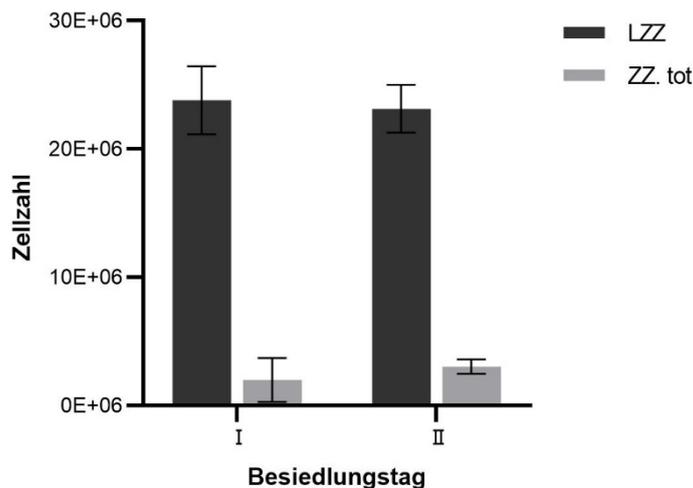


Abbildung 24 Menge der Endothelzellausbeute für die Besiedlung einer BioVaSc an Besiedlungstag I und II. LZZ = Lebendzellzahl, ZZ. tot = Zellzahl tot. $n=4$

4.4.2 Kultur des Augmentats

Nach erfolgter Besiedlung der Kapillarstrukturen wurde die BioVaSc für zwei Wochen in einem Bioreaktorsystem kultiviert. Wichtig ist, neben der konstanten Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 %, der auf das Kapillarsystem der BioVaSc ausgeübte Druck. Während der ersten beiden Besiedlungstage steigerte sich der pulsatile Druck innerhalb von 8 Stunden von 0-40 mmHg auf 80-120 mmHg. Mit Hilfe dieses Besiedlungsmodus des Inkubatorwagens konnten sich die kürzlich eingebrachten mvEC an die Bedingungen adaptieren und adhären. Durch den entstehenden Fluidstrom wurden die mvEC einem Scherstress ausgesetzt und so unter möglichst physiologischen Bedingungen kultiviert. In der Vorratsflasche befand sich ein Luftfilter der den Gasaustausch im System ermöglicht. Ein zu niedriger Druck gewöhnt die mvEC nach erfolgter Blasenaugmentation nicht an den späteren physiologischen Blutfluss des Tieres bzw. Menschen, ein zu hoher Druck kann die mvEC und das Gewebe stark belasten und zur Ablösung der mvEC oder Gefäßruptur führen. Abb. 25 A zeigt exemplarisch von

Ergebnisse

Experiment II einen vollständigen Druckverlauf während der zweiwöchigen Kultivierung einer BioVaSc sowie Abb. 25 B die ersten beiden Tage im Besiedlungsmodus des Inkubatorwagens der Experimente II, III und IV im Vergleich. In Experiment I wurde kein Druckverlauf aufgezeichnet.

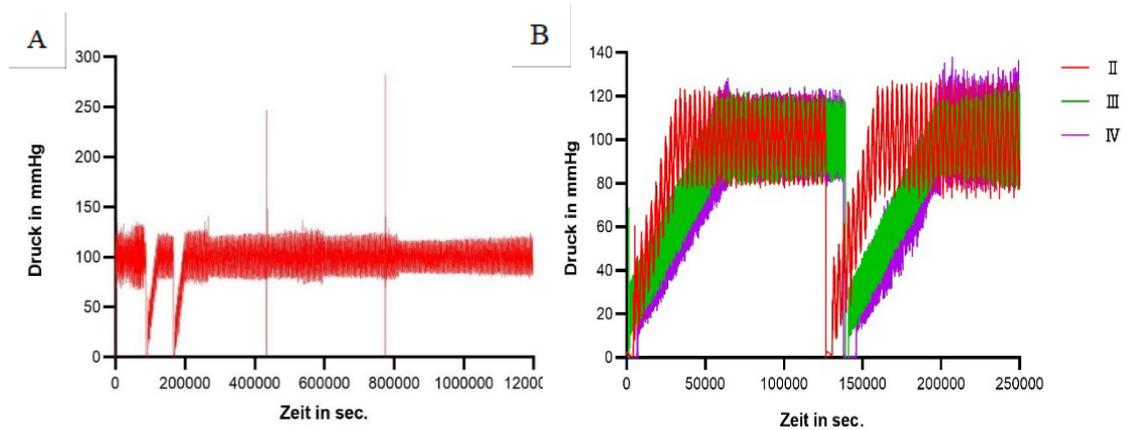


Abbildung 25 Druckverläufe einer zweiwöchigen BioVaSc-Besiedlung in Sekunden und mmHG im Bioreaktorsystem.

A) Vollständiger Druckverlauf der BioVaSc des zweiten Besiedlungsexperiments im Kultivierungsreaktor über 14 Tage. B) Besiedlungsprogramm des Kultivierungsreaktors an Tag 1 und 2 der Besiedlungsexperimente II, III und IV.

In Abb. 25 A sind die einzelnen Zwischenschritte während einer zweiwöchigen Besiedlung im Verlauf gut zu erkennen. Zu Beginn wurde die unbesiedelte BioVaSc zur Adaption an die neuen Bedingungen am Vortag in das Bioreaktorsystem eingebracht. Anschließend erfolgten die beiden Besiedlungstage. Während der Besiedlung der BioVaSc mit Zellen unter der Zellkulturbank ist ein Abfall des Drucks auf 0 mmHg zu verzeichnen. Nach erneutem Einbringen der BioVaSc in den Reaktor kommt es zu einer konstanten Drucksteigerung bis 80-120 mmHg. Bis zum Ende der Kultivierung der mvEC im Kapillarsystem wurde der möglichst konstante Flüssigkeitsfluss zweimal durch einen Wechsel mit frischem Medium unterbrochen. Der sichtbare zweifache Ausbruch des Drucks bis fast 300 mmHg entstand durch das erneute Einschalten der Pumpe nach erfolgtem Mediumwechsel. Der Flüssigkeitsstrom muss erst am Drucksensor ankommen um, durch den Widerstand der BioVaSc, rückkoppelnd ein Signal zur Geschwindigkeitsreduktion der Pumpe zu senden. Damit die BioVaSc durch diese Druckspikes nicht geschädigt wurde, wurde der zuführende Schlauch nach dem Drucksensor abgeklemmt und sendet somit ein Signal zur Reduktion der Pumpgeschwindigkeit. Daraufhin konnte der Schlauch langsam wieder geöffnet werden

und der Flüssigkeitsstrom erreichte die BioVaSc. Abb. 25 B zeigt im Detail die ersten beiden Besiedlungstage der Experimente II, III und IV im Vergleich. Experiment II zeigte eine langsamere Rotation der pulsatilen Pumpe als bei Experiment III und IV. Ausschlaggebend ist das Signal der eingespannten BioVaSc, das rückkoppelnd über den Drucksensor die Pumpe erreicht und deren Geschwindigkeit regelt. Daraus lässt sich schließen, dass diese Pumpe der Experimente III und IV auf Grund eines nachgiebigeren Gefäßsystems schneller laufen musste um den gewünschten Druckbereich einzuhalten. Bei Beendigung des Besiedlungsmodus lagen alle drei Experimente am ersten Tag fast annähernd gleich im Bereich von 80-120 mmHg. Nach dem zweiten Besiedlungsmodus unterschied sich die Differenz der Druckamplitude der drei Experimente sichtbar etwas stärker. Dies mag an der Veränderung des Kapillarsystems, durch die Menge an kürzlich eingebrachten mvEC und der Reaktion der jeweiligen BioVaSc mit ihren unterschiedlichen Beschaffenheiten, liegen. In Experiment III und IV kam es zu Unregelmäßigkeiten des Drucks mit einem enormen Anstieg der Amplitude (Abb. 26). Das Luftpolster in der Druckflasche reduzierte sich bis die Flasche nur noch mit Medium gefüllt war. Dadurch wurde die BioVaSc für ca. 20-23 h einem höheren Druck ausgesetzt.

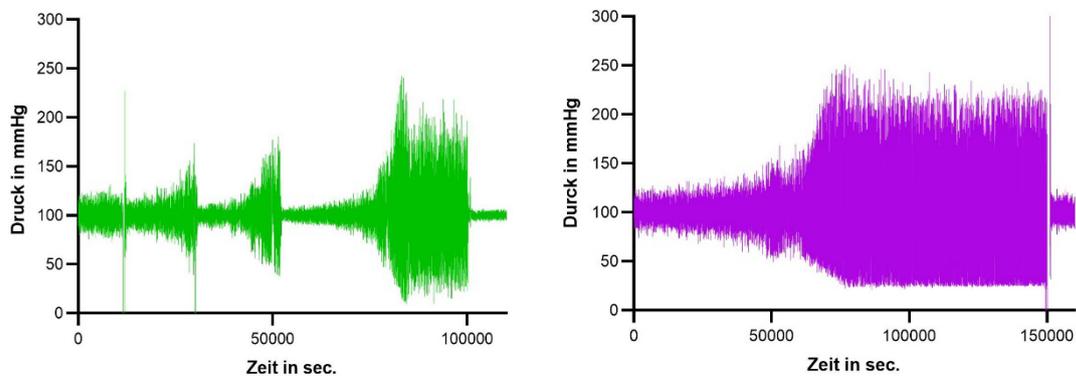


Abbildung 26 Ausschnitt des Druckverlaufs in Sekunden und mmHg der Experimente III (grün) und IV (lila) mit Unregelmäßigkeiten in der Amplitude. Es kam zur Amplitudenerhöhung des Drucks über eine Dauer von ca. 20 h.

Die Auswirkungen dieser Abweichungen werden in den folgenden Qualitätssicherungsmaßnahmen am endothelialisierten Augmentat im Zusammenhang mit den Testungen an der BioVaSc erörtert.

4.5 Qualitätssicherungsmaßnahmen am endothelialisierten Augmentat

Nach der zweiwöchigen Besiedlungsphase wurde die UroVaSc verschiedenen Qualitätssicherungsmaßnahmen unterzogen. Zu diesen gehören der Nachweis der Zellviabilität mittels MTT, der Nachweis der Gefäßdurchgängigkeit mittels sterilem Phenolrot, Endotoxin und Mykoplasmenmessungen sowie histologische Untersuchungen.

4.5.1 Experiment I

Für das erste Besiedlungsexperiment wurde die BioVaSc GMP B74 mit einer Qualitätsbewertung 3 verwendet. Während der zweiwöchigen Kultivierungsphase waren keine Unregelmäßigkeiten im Druckverlauf (Abb. 25 A) zu erkennen. Da der Versuchsaufbau noch nicht vollständig etabliert war, fand in diesem Experiment kein Nachweis der Zellviabilität mittels MTT und kein Nachweis der Gefäßdurchgängigkeit mittels sterilem Phenolrot statt. In Abb. 27 sind die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zu erkennen. Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen wurde die Identität der Zellen nachgewiesen. Die immunhistochemische Färbung der besiedelten Gefäßstrukturen zeigte eine hohe Besiedlungsdichte mit mikrovaskulären, CD31-positiven-Endothelzellen, nachweisbar durch die braune Färbung gegen CD31 (Abb. 27 B und C). Nicht nur die großen Gefäße konnten erfolgreich rebesiedelt werden, auch kleinere Gefäße und Kapillaren waren positiv für den Endothelzellmarker CD31 (Abb. 27 B). Auffällig war jedoch, dass sich vermehrt in den arteriellen Gefäßen ein neues Endothelzelllayer gebildet hat, in den venösen Bereichen nur ein unregelmäßiges bis kein Endothelzelllayer vorhanden war (Abb. 27 C und F). Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 konnte erneut die Identität der mvEC bestätigt werden (Abb. 27 D). Sehr gut zu erkennen ist ein gleichmäßiger Endothelzellsaum im Gefäßinneren in gelb (CD31). Die Zellkerne werden blau (DAPI) dargestellt. Die HE- und Feulgen Färbung wurden als Routinefärbungen mitgeführt. Hämalaun färbt die Zellkerne blau und Eosin färbt u.a. Zytoplasma und Kollagenfasern rot. Die Feulgen Färbung färbt vorhandene DNA durch das basische Fuchsin violett. Bei diesen beiden Färbungen konnte ebenfalls eine Rebesiedlung der Gefäßstrukturen der BioVaSc identifiziert werden (Abb. 27 E und F). Auch der geringere Besiedlungserfolg der venösen Gefäße wurde mit der HE- und Feulgen Färbung erneut deutlich.

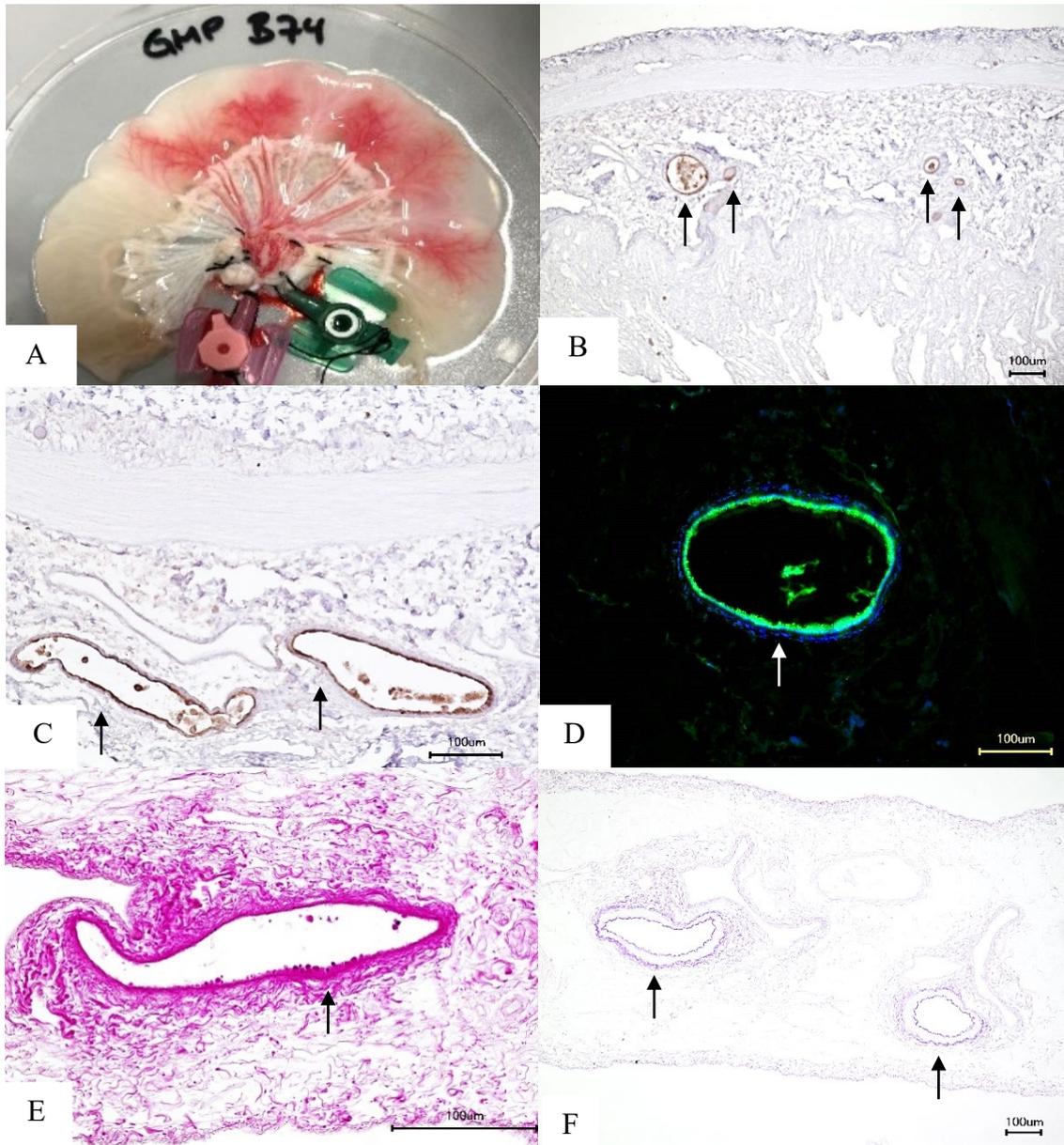


Abbildung 27 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B74.

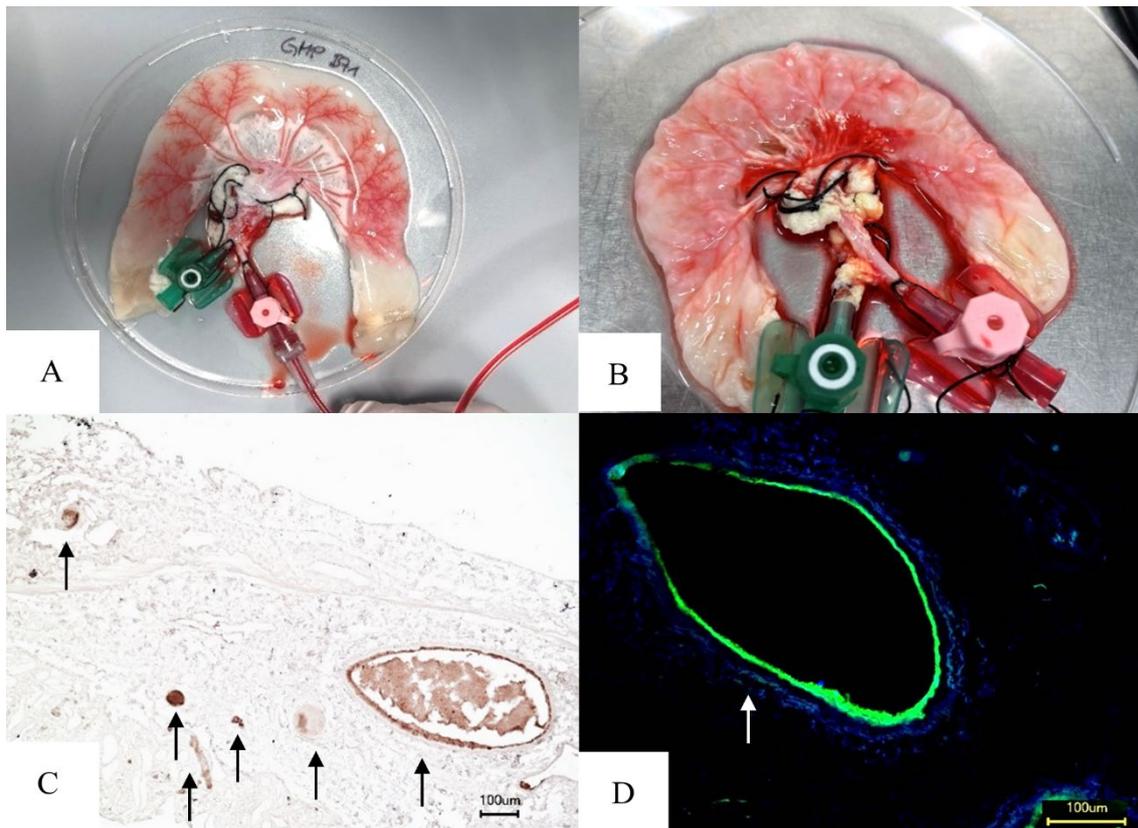
A) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach dem Prozess der Dezellularisierung. Steriles Phenolrot wurde über den Gefäßanschluss in die Gefäße infundiert. B) und C) Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31. D) Immunfluoreszenz Färbung der Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31 (grün). Zellkerne werden mit DAPI (blau) angefärbt. E) Hämalaun-Eosin Färbung. Zellen sind blau, Matrix rot gefärbt. F) Feulgen Färbung. DNA stellt sich pink dar. Die Pfeile zeigen auf mit Endothelzellen besiedelte Gefäße. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

4.5.2 Experiment II

Für das zweite Besiedlungsexperiment wurde die BioVaSc GMP B71 mit einer Qualitätsbewertung 2 verwendet. Während der zweiwöchigen Kultivierungsphase waren auch hier keine Unregelmäßigkeiten im Druckverlauf zu erkennen. Nach erfolgter Besiedlung mit mvEC wurde im Anschluss die Gefäßdurchgängigkeit mittels sterilem

Ergebnisse

Phenolrot überprüft. Das Phenolrot floss über den arteriellen Anschluss gleichmäßig in alle großen Gefäße und verzweigte sich anschließend in die jeweils kleineren Gefäße und Kapillaren. Die baumartige Gefäßstruktur der UroVaSc war gut zu erkennen (Abb. 28 B). Die HE- und Feulgen Färbung zeigte, dass vorhandene Zellen als eine dünne Schicht das Innere der Gefäße auskleidet (Abb. 2 E und F). Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung und der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Identität der mvEC durch eine kontinuierliche Braunfärbung sowie ein gleichmäßiges gelbes Fluoreszenzsignal im Gefäßlumen bestätigt (Abb. 28 C und D). Auch in diesem Experiment konnten neben den großen Gefäßen die kleinen Gefäßbereiche erfolgreich besiedelt werden. Die verschiedenen histologischen Schnitte wurden im Bereich des Mesenterium und dem Lumen der UroVaSc hergestellt. Es konnten keine Unterschiede im Erfolg der Endothelzellbesiedlung zwischen diesen beiden Bereichen erkannt werden. Während der beiden Besiedlungstage verteilten sich alle in die BioVaSc eingebrachten Zellen gleichmäßig im gesamten Gefäßsystem.



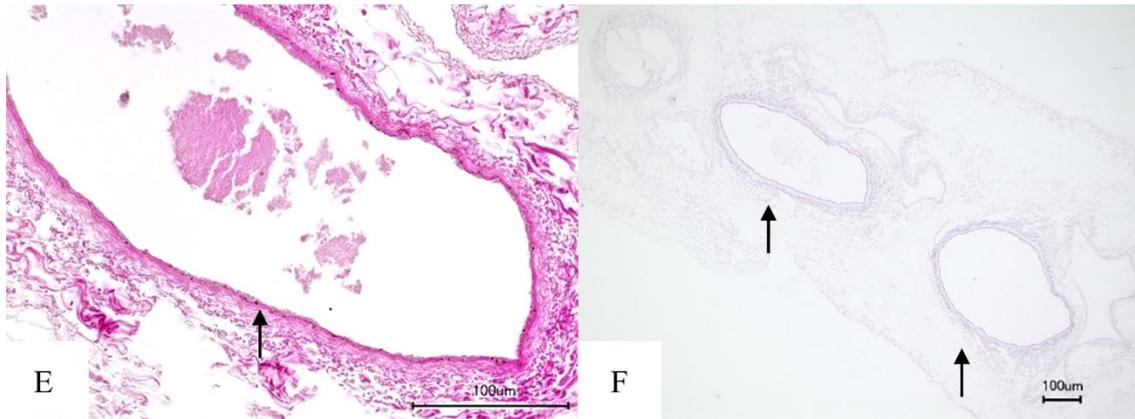


Abbildung 28 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B71.

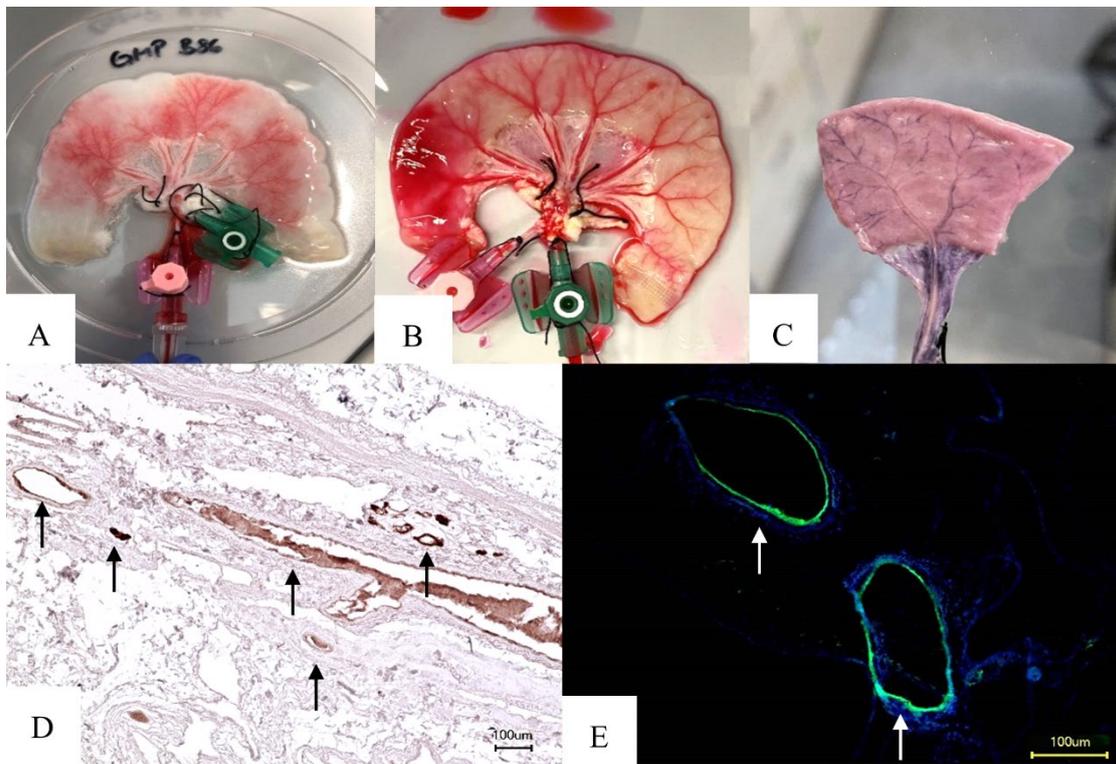
A) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach dem Prozess der Dezellularisierung. Steriles Phenolrot wurde über den Gefäßanschluss in die Gefäße infundiert. B) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach einer zweiwöchigen Besiedlung mit Endothelzellen. C) Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31. D) Immunfluoreszenz Färbung der Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31 (grün). Zellkerne werden mit DAPI (blau) angefärbt. E) Hämalaun-Eosin Färbung. Zellen sind blau, Matrix rot gefärbt. F) Feulgen Färbung. DNS stellt sich pink dar. Die Pfeile zeigen auf mit Endothelzellen besiedelte Gefäße. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

4.5.3 Experiment III

Für das dritte Besiedlungsexperiment wurde die BioVaSc GMP B90 mit einer Qualitätsbewertung 3 verwendet. Während der zweiwöchigen Kultivierungsphase kam es in diesem Experiment nach dem zweiten Mediumwechsel im Bioreaktorsystem zu Unregelmäßigkeiten im Druckverlauf (Abb. 26). Optisch war dies an einem zu hohen Ist-Wert der Druckkurve am Bildschirm des Inkubatorwagens und einer Veränderung der Flüssigkeitsmenge in der Druckflasche zu erkennen. Es befand sich zu viel Medium mit einem folglich zu kleinen Luftpolster in der Druckflasche. Dies entstand entweder durch einen Rückstau des Mediums in der Druckflasche, da nicht genug Medium in die BioVaSc lief oder durch einen zu schnellen Fluss des Mediums in die Druckflasche hinein. In jedem Fall kam es zu einem Problem der Konstanz des Flüssigkeitsflusses im Bioreaktorsystem. Durch das kleine bis nicht vorhandene Luftpolster in der Druckflasche erhöhte sich der Druck auf die nachfolgende BioVaSc. Nach Korrektur des Luftpolsters stieg der Ist-Druck zwei weitere Male bis 250 mmHg an, verlief nach erneuter Korrektur anschließend wieder konstant mit den optimalen Druckwerten bis maximal 120 mmHg. Die Folge dieser Unregelmäßigkeit mit sehr hohen Druckwerten zeigte sich beim Nachweis der Gefäßdurchgängigkeit mit Phenolrot. Der starke Druckanstieg schädigte den arteriellen Zufluss der UroVaSc, sodass ein Phenolrottest nur über den venösen Anschluss möglich war (Abb. 29 B). Das Phenolrot floss bereits im Bereich des

Ergebnisse

Mesenteriums in die Petrischale. Dies lässt auf eine Schädigung durch den zu hohen Druck direkt am Gefäßknoten schließen. Die bereits vorhandenen Undichtigkeiten im Gefäßsystem des Lumens vor der Besiedlung waren auch nach der Besiedlung entsprechend zu erkennen. Die histologischen- und immunhistologischen Untersuchungen zeigten die gleichen Ergebnisse wie bereits die Experimente I und II. Eine gleichmäßige Ausbildung eines mikrovaskulären Endothelzelllayers im Inneren der arteriellen Gefäße war zu erkennen (Abb. 29 D und E). Die venösen Bereiche zeigten eine weniger bis nicht vorhandene Besiedlung mit mvEC (Abb. 29 D). In den Gefäßstrukturen der UroVaSc ließen sich lebende Zellen mit Hilfe des MTT Test nachweisen (Abb. 29 C). Die Aufnahme eines Lumenteilstückes des besiedelten Darmsegments zeigte vitale Zellen innerhalb der Gefäßstrukturen.



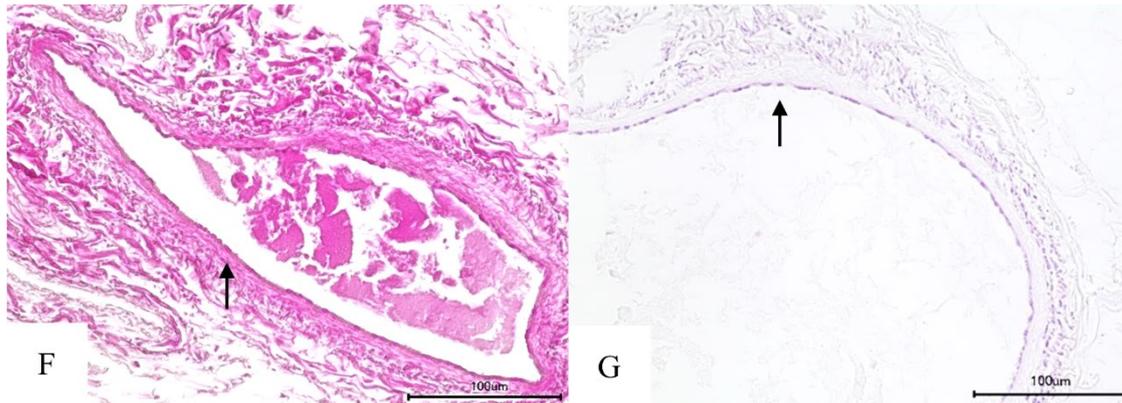


Abbildung 29 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B90.

A) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach dem Prozess der Dezellularisierung. Steriles Phenolrot wurde über den Gefäßanschluss in die Gefäße infundiert. B) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach einer zweiwöchigen Besiedlung mit Endothelzellen. C) Makroskopische Aufnahme eines besiedelten BioVaSc Abschnitts, gefärbt mit MTT. D) Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31. E) Immunfluoreszenz Färbung der Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31 (grün). Zellkerne werden mit DAPI (blau) angefärbt. F) Hämalaun-Eosin Färbung. Zellen sind blau, Matrix rot gefärbt. G) Feulgen Färbung. DNA stellt sich pink dar. Die Pfeile zeigen auf mit Endothelzellen besiedelte Gefäße. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

4.5.4 Experiment IV

Für das vierte Besiedlungsexperiment wurde die BioVaSc GMP B86 mit einer Note befriedigend (3) verwendet. Während der zweiwöchigen Kultivierungsphase kam es in diesem Experiment zwischen dem ersten und zweiten Mediumwechsel im Bioreaktorsystem zu Unregelmäßigkeiten im Druckverlauf (Abb. 26). Der Druck stieg über Nacht konstant bis auf 250 mmHg an, wurde am Morgen korrigiert und entsprach anschließend wieder dem gewünschten Druck von 80mmHg zu 120 mmHg. Ähnlich wie im dritten Experiment verschwand das Luftpolster in der Druckflasche, dies führte zu einem höheren Druck der auf die anschließende BioVaSc ausgeübt wurde. Die Folge des Druckanstiegs zeigte sich im Phenolrottest mit einer Undichtigkeit im Gefäßsystem im Bereich des Lumens am linken unteren Rand der UroVaSc (Abb. 30 B). Ansonsten floss das Phenolrot gleichmäßig über den arteriellen Anschluss in das gesamte Gefäßsystem. Einige Stellen, die im Lumenbereich nach dem Dezellularisierungsprozess nicht für Phenolrot durchgängig waren, zeigten nach dem Besiedlungsprozess ein gleichmäßiges baumartiges Bild des Gefäßsystems. Der MTT Test wies durch die Blaufärbung vitale Zellen in den Gefäßstrukturen nach (Abb. 30 C). Die histologischen- und immunhistologischen Untersuchungen entsprachen den Ergebnissen der vorherigen Experimente (Abb. 30 D und E).

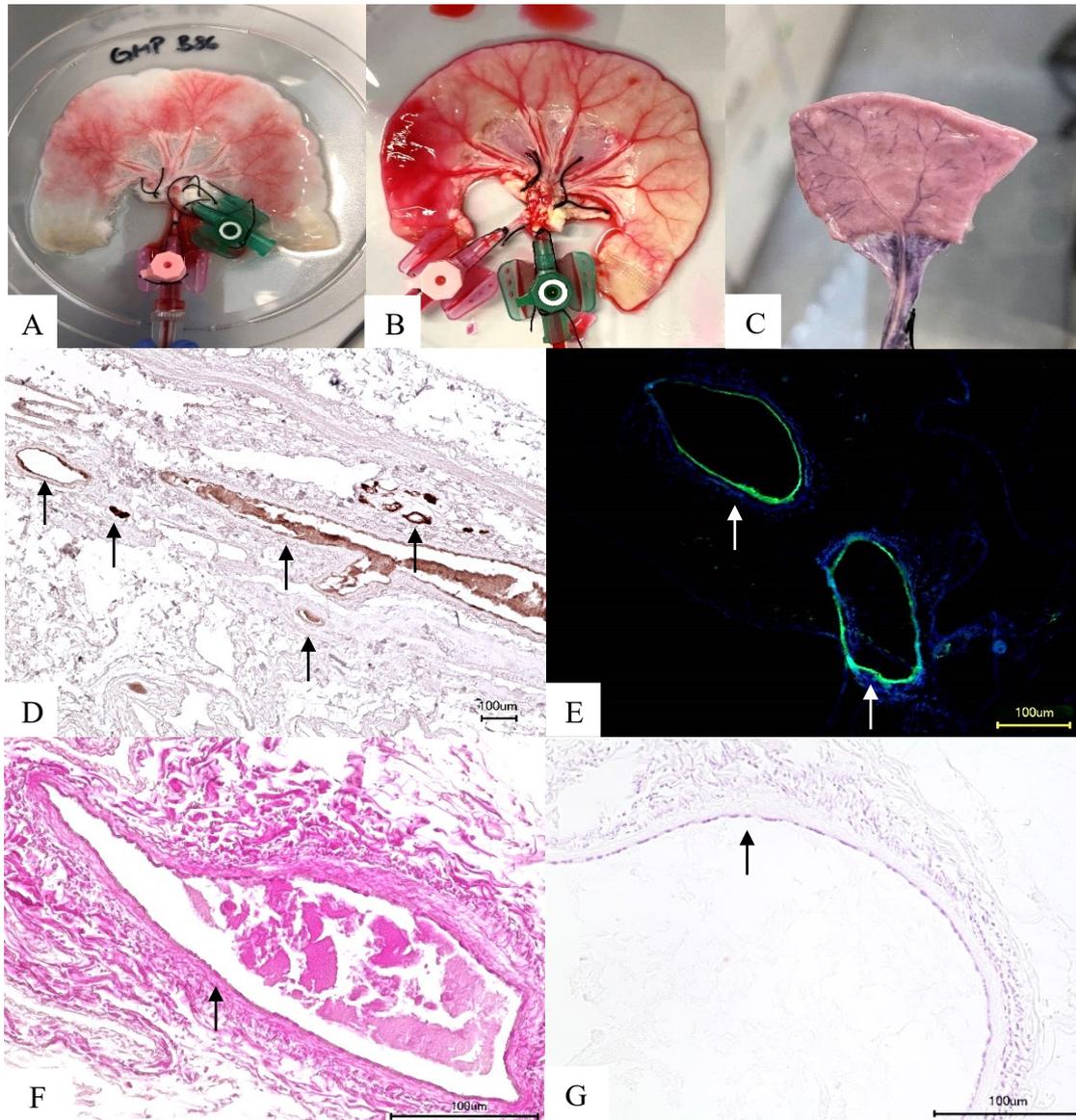


Abbildung 30 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B86.

A) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach dem Prozess der Dezellularisierung. Steriles Phenolrot wurde über den Gefäßanschluss in die Gefäße infundiert. B) Makroskopische Aufnahme des Phenolrottests nach einer zweiwöchigen Besiedlung mit Endothelzellen. C) Makroskopische Aufnahme eines besiedelten BioVaSc Abschnitts, gefärbt mit MTT. D) Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31. E) Immunfluoreszenz Färbung der Endothelzellen mit einem Primärantikörper gegen CD31 (grün). Zellkerne werden mit DAPI (blau) angefärbt. F) Hämalaun-Eosin Färbung. Zellen sind blau, Matrix rot gefärbt. G) Feulgen Färbung. DNA stellt sich pink dar. Die Pfeile zeigen auf mit Endothelzellen besiedelte Gefäße. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

4.5.5 Endotoxin- und Mykoplasmenmessung

Um nachweisen zu können, dass die in eine BioVaSc eingebrachten mvEC und die zweiwöchig besiedelte BioVaSc frei von Endotoxinen und Mykoplasmen sind, wurden entsprechende Messungen vorgenommen. Eine Probe des Mediumüberstandes der finale Zellpassage (P2, P3 oder P4) sowie eine Probe des im Bioreaktorsystem befindlichen

Medium (Freigabe) wurde entnommen und vermessen. In keinem der durchgeführten Experimente kam es zu einer Kontamination mit Endotoxinen oder Mykoplasmen. Die ermittelten Werte der Messungen sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tabelle 20 Ergebnisse der Endotoxin- und Mykoplasmenmessung

Experiment	Probenwert Endotoxin	Mykoplasmen
I P2	< 0,500 EU/ml	negativ
I Freigabe	< 0,500 EU/ml	negativ
II P3	0,589 EU/ml	negativ
II Freigabe	< 0,500 EU/ml	negativ
III P4	0,906	negativ
III Freigabe	0,516	negativ
IV P4	0,503 EU/ml	negativ
IV Freigabe	< 0,500 EU/ml	negativ

4.6 GMP konformes Freigabeprotokoll

Die Good Manufacturing Practice (GMP) beinhaltet Richtlinien zur Qualitätssicherung von Produktionsabläufen. Die Qualität von hergestellten Produkten muss stark reguliert werden, da eine unzureichende Qualität für den Patienten negative Gesundheitsrisiken mit sich bringen kann. In dieser Arbeit wurden für die Zwischenprodukte und das Endprodukt GMP konforme Freigabeprotokolle erstellt.

4.6.1 Freigabe der Zwischenprodukte

Um die Qualität im Verlauf des Produktionsprozesses gewährleisten zu können, wurden bestimmte Anforderungen an die Zwischenprodukte gestellt und diese überprüft. Ein wichtiges Zwischenprodukt stellen die aus Schweinehaut isolierten, primären mvEC dar, die vorbereitend für die Besiedlung einer BioVaSc kultiviert und vermehrt wurden. Die Anforderungen an die mvEC sind in Tab. 21 dargestellt.

Tabelle 21 GMP konformes Freigabeprotokoll für primäre mikrovaskuläre Endothelzellen

Endothelzellen	Methode	Spezifikation
Morphologie	Lichtmikroskopie	Pflastersteinförmig, klonales Wachstum
Reinheit - CD31 – FITC	Durchflusszytometrie	≥ 90 %

- CD31	Immunfluoreszenz	$\geq 90 \%$
- Anti-Alpha Actin	Immunfluoreszenz	$\leq 10 \%$
- Isotypenkontrolle	Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz	Negativ
Mikrobiologie		
- Endotoxin	LAL-Test, kinetisch- turbidimetrisch	≤ 1.0 EU/ml
- Mykoplasmen	Mycoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs®	Negativ
- Bakterienwachstum	BactAlert	Kein Wachstum nach 14 Tagen

Um die Qualität der mvEC zu überprüfen, wurden die Faktoren Morphologie, Reinheit und Mikrobiologie untersucht. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie sollten die mvEC ein pflastersteinförmiges, klonales Wachstum aufweisen. Mit durchflusszytometrischen Analysen wurde die Reinheit der Zellkultur überprüft. Diese sollte bei Verwendung des Antikörpers CD31-FITC mind. 90 % aufweisen. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenz Färbungen gegen CD31 wurde eine Reinheit von ebenfalls mind. 90 % gefordert. Myofibroblasten durften nur zu $\leq 10 \%$ durch eine IF Färbung gegen Anti-Alpha Actin nachgewiesen werden. Die Isotypkontrollen bei FACS und IF Auswertungen mussten negativ sein. Im Bereich der Mikrobiologie wurde der Endotoxingehalt mit Hilfe des LAL-Tests nachgewiesen und sollte einen Wert von ≤ 1.0 EU/ml nicht überschreiten. Die Mykoplasmenmessungen mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs® mussten negativ ausfallen. Um ein Bakterienwachstum ausschließen zu können wurden 3 ml Zellkulturüberstand mit BactAlert inokuliert. Nach 14 Tagen durfte kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Wurden die Freigabekriterien erfüllt, erfolgte die Freigabe der mvEC und die Besiedlung der BioVaSc.

Ein weiteres Zwischenprodukt, das einer Qualitätskontrolle unterzogen wurde, ist die BioVaSc. Die in Tab. 22 gelisteten Kriterien mussten für eine Freigabe erfüllt sein. Morphologisch ließ sich der Erfolg des Dezellularisierungsprozesses durch das Entfärben der BioVaSc beurteilen. Durch die Lyse und den Abtransport von Blut und Zellen stellte sich das Jejunumsegment weiß dar. Eine vollständige Entfärbung bestätigt makroskopisch eine erfolgreiche Dezellularisierung. Um eine Bakterienfreiheit zu

gewährleisten wurde Kulturmediumüberstand mit BactAlert inokuliert und kontrolliert, dass es in 14 Tagen zu keinem Bakterienwachstum kam. Mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs® wurde auf einen negativen Mykoplasmentest geprüft. Um Gallsäurerückstände in der dezellularisierten BioVaSc auszuschließen, wurde ein Gallsäureassay durchgeführt. Die Ergebnisse durften einen Wert von 49 µmol/l nicht überschreiten. Damit alle Gefäße der BioVaSc durchgängig sind und eine gute Grundlage für eine Rebesiedlung mit mvEC bieten, wurde der Phenolrottest durchgeführt. Das Ergebnis des Tests wurde mit einem Scoring von 1-6 bewertet.

Tabelle 22 GMP konformes Freigabeprotokoll

BioVaSc	Methode	Spezifikation
Qualität		
- Morphologie	Makroskopische Evaluation	Weiß
- Gehalt Gallsäure	Gallsäureassay	< 50 µmol/l
- Gefäßdurchgängigkeit	Phenolrottest	Scoring 1-6
Mikrobiologie		
- Mykoplasmen	Mycoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs®	Negativ
- Bakterien	BactAlert	Kein Wachstum nach 14 Tagen
- Endotoxine	LAL-Test, kinetisch-turbidimetrisch	≤ 1.0 EU/ml

4.6.2 Freigabe des Endproduktes

Nach einer erfolgreichen Rebesiedlung einer BioVaSc mit mvEC entsteht eine UroVaSc. Der Prozessschritt der UroVaSc Reifung, sowie das fertige Produkt, mussten auch verschiedenen Qualitätskontrollen unterzogen werden. Die Morphologie wurde makroskopisch überprüft. Im gesamten Bioreaktorsystem durfte es nicht zu einer Trübung des Kulturmediums kommen. Außerdem musste durch den angelegten Druck und das pulsativ fließende Medium durch das Bioreaktorsystem ein Tonus des Jejunums zu erkennen sein. Der Gefäßdruck wurde durch den Drucksensor und die Software des Inkubatorwagens kontrolliert und auf einem Monitor angezeigt. Der Druck sollte pulsativ und mit 80-120 mmHG (± 10 mmHg) durch das Jejunum laufen. Die Überprüfung der Mikrobiologie mit entsprechender Endotoxin- und Mykoplasmenmessung, sowie der

Kontrolle des Bakterienwachstums, wurde wie bereits in Abschnitt 4.6.1 „Freigabe der Zwischenprodukte“, durchgeführt.

Tabelle 23 GMP konformes Freigabeprotokoll der Endoproduktes UroVaSc

UroVaSc	Methode	Spezifikation
Morphologie	Makroskopische Evaluation	Keine Trübung des Kulturmediums, Tonus sichtbar
Gefäßdruck	Drucksensor/ Software	Pulsativ, 80-120 mmHg (± 10 mmHg)
Temperatur	Temperatursensor/ Software	37 °C ± 0,2-0,3
CO² Gehalt	CO ² Sensor/Software	5 % ± 0,2-0,3
Mikrobiologie		
- Endotoxin	LAL-Test, kinetisch-turbidimetrisch	≤ 1.0 EU/ml
- Mykoplasmen	Mycoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs®	Negativ
- Bakterienwachstum	BactAlert	Kein Wachstum nach 14 Tagen

5 Diskussion

Wissenschaftliche Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung eines dreidimensionalen, vaskularisierten Augmentats zur Rekonstruktion der Blase im Kindesalter durch den Einsatz moderner, gewebetechnologischer Verfahren. Forschungsschwerpunkte lagen in folgenden Bereichen des Tissue Engineerings: (a) Isolation und Kultivierung primärer, mikrovaskulärer Endothelzellen aus einer porcinen Hautbiopsie; (b) Rebesiedlung und Kultur des autologen Blasenaugmentats durch die Einbringung der Endothelzellen in eine Biomatrix; (c) Qualitätskontrollen der Zwischenprodukte und des Endprodukts unter den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (GMP).

Verletzungen oder Fehlbildungen der Blase im Kindesalter stellen eine große Herausforderung dar. Bisher haben azelluläre oder mit Zellen besiedelte Biomaterialien oder autologer Darm trotz aussichtsreicher präklinischer Ergebnisse nicht zu verbreiteter klinischer Akzeptanz geführt. Hauptursache war die fehlende Vaskularisierung des implantierten Gewebes und die damit verminderten metabolischen und immunologischen Eigenschaften (Schaefer & Stehr, 2018). Um die Problematik der Minderperfusion des Augmentats zu lösen, wurde eine BioVaSc-TERM[®], eine anastomosierbare Trägerstruktur auf Basis eines dezellularisierten, porcinen Jejunumsegments, mit porcinen Endothelzellen rebesiedelt und zum Endprodukt, der UroVaSc, kultiviert.

5.1 Isolation und Kultivierung der Endothelzellen

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Protokolle zur mikrovaskulären Endothelzellisolation verschiedener Organe des Schweines publiziert. Es wurden Endothelzellen aus dem Herz (Hätinen et al., 2019), Blut (Jamiolkowski et al., 2015), Fett (Young et al., 1992), Gehirn (Patabendige & Abbott, 2014), Ovar (Basini et al., 2014), Hoden (Plendl et al., 1996) und der Aorta (Plendl et al., 1996) des Schweines isoliert. Die Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Haut des Schweines kommt der zukünftigen Anwendung am Menschen mit einer geplanten Isolation der Endothelzellen aus der eigenen Haut des Patienten am nächsten. Die Haut betreffend besteht die offensichtlichste Ähnlichkeit, mit Ausnahme der Wollschweintrassen, darin, dass Menschen und Schweine eine geringe Körperbehaarung teilen. Aber auch Parameter wie

die Morphologie und Struktur der Haut ähneln sich bei Mensch und Schwein (Khiao In et al., 2019). Protokolle zur Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Haut des Menschen wurden bereits mit Erfolg etabliert (Kress et al., 2018).

5.1.1 Spendervarianz

Um mit primären Endothelzellen arbeiten zu können wurden diese vorher aus der Dermis einer Hautbiopsie eines Spenderschweines isoliert. Die porcinen, primären Endothelzellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden aus Hautbiopsien verschiedener operativer Eingriffe von Schweinen der deutscher Landrasse isoliert. Im Rahmen der Vorversuche wurde die Entnahmestelle am Ohr mit einer Entnahme am Bauch des Schweines verglichen, um die optimalen Endothelzellausbeuten zu erreichen. Die Ohrbiopsie ließ sich während der Aufbereitung schlechter verarbeiten, da die zu entfernende Fettschicht schwieriger und nicht im Ganzen abzupräparieren war. Außerdem besaß die Ohrbiopsie eine dünnere Dermis als die Biopsie vom Bauch, wodurch der Übergang von der Dermis zur angrenzenden Fettschicht schwieriger zu erkennen war. Die Dicke der Dermis könnte in diesem Fall einen Grund für die fast doppelt so große Menge an isolierten Endothelzellen aus der Bauchbiopsie darstellen. Diese Vermutung bestätigten Khiao In et al.. Sie untersuchten Hautbiopsien unterschiedlicher Entnahmestellen am Schwein und stellten fest, dass sich die Dicke der Dermis am Ohr mit $952.4 \pm 127 \mu\text{m}$ mit der Dicke der Dermis am Bauch (Flanke) mit $1877.0 \pm 68 \mu\text{m}$ eindeutig unterscheidet (Khiao In et al., 2019). Obwohl in allen folgenden Experimenten die Biopsieentnahme am Bauch des Schweines stattfand, konnte in Abb. 11 verdeutlicht werden, dass die Lebendzellausbeute aller Experimente zwischen $0,36 \times 10^6$ und $0,94 \times 10^6$ Zellen ($n= 9$, $SD= 0,24$) lag. Die stark variierenden Zellausbeuten lassen sich vermutlich auf die Spendervarianz zurückführen, denn jedes Spenderschwein stellt ein Individuum dar. Dies wird durch die Ergebnisse der Experimente IV, V und VI bestätigt. In diesen Experimenten wurden jeweils zwei Hautbiopsien vom gleichen Schwein entnommen und anschließend die primären, mikrovaskulären Endothelzellen isoliert. Die Höhe der Zellausbeuten zweier Hautbiopsien vom gleichen Spendertier näherten sich einer identischen Zellausbeute (Experiment IV: $SD= 0,01$; Experiment V: $SD= 0,04$; Experiment VI: $SD= 0,03$) an. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellausbeute aus Hautbiopsien verschiedener

Spendertiere sehr stark variiert, die Zellzahl von Hautbiopsien des gleichen Spenderschweines annähernd identische Endothelzellmengen ergibt.

Es wurden Hautbiopsien von Heinrichs Tierzucht GmbH in Heinsberg und vom Schweinezuchtbetrieb K. Niedermeyer in Dettelbach präpariert. Die Tiere unterschieden sich in Geschlecht, Alter und Gewicht (Tab. 2). Die Schweine aus Heinsberg waren weiblich, älter und schwerer. Die Schweine aus Dettelbach waren männlich, leichter und jünger. Bei der Quantifizierung der erhobenen Daten war eine Abhängigkeit der Endothelzellausbeute von jedem Spendertier festzustellen.

Die hohe Übereinstimmung der Zellausbeute bei gleichem Spendertier kann als Beleg gewertet werden für die hohe Standardisierung der komplexen Endothelzellisolierung.

Der in Abb. 12 beobachtete negative Einfluss eines längeren Zeitintervalls zwischen der Entnahme einer Hautbiopsie und der Endothelzellisolierung lässt sich vermutlich auf die verlängerte Ischämiezeit und die erhöhte Zahl hypoxischer Zellnekrosen bei ausgedehnter Lagerung zurückführen. Daraus lässt sich schließen, dass durch eine zeitnahe Präparation der entnommenen Spenderhaut die besten Ergebnisse der Endothelzellausbeute zu erreichen sind.

5.1.2 Reinheit der Endothelzellkultur

Damit für eine Besiedlung einer BioVaSc ausreichend Zellen zur Verfügung stehen, wurden die mvEC in Kultur gebracht und vermehrt. Während der Isolierung der mvEC aus der Dermis wurden auch andere Zelltypen isoliert und mit in Kultur gebracht. Im Verlauf der Experimente kam es regelmäßig zu einem Überwachsen dieser unerwünschten Zelltypen mit der Folge einer entstehenden Mischkultur. McDouall et al. bestätigten die Gefahr der Kontamination isolierter, primärer mvEC mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen (McDouall et al., 1996). Um Kontaminationen mit Fremdzellen zu minimieren oder zu verhindern gibt es verschiedene Strategien. Bereits während der Aufbereitung einer Spenderbiopsie wurden Dermis und Epidermis voneinander getrennt und somit ein Teil der nicht erwünschten Zellen wie Melanozyten oder Keratinozyten aus der Endothelzellkultur entfernt. Durch die Anwendung der Dispase wurde nicht nur die Dermis von der Epidermis getrennt, sondern auch das Gewebe der Dermis aufgelockert und folglich der Prozess des Ausstreichens der Hautbiopsie mit einem Skalpell vereinfacht. Eine weitere Maßnahme zur Erhöhung der Endothelzellreinheit ist die

Anwendung eines endothelzellspezifischen Mediums. Die frisch isolierten mvEC wurden in einem für mikrovaskuläre Endothelzellen selektiven Medium, VascuLife VEGF, kultiviert. Durch die im Medium enthaltenen Zusätze wird das Wachstum der Endothelzellen unterstützt (Klagsbrun & D'Amore, 1991). Trotz bereits optimierter Bedingungen kam es im Verlauf der Kultivierung zu einer Kontamination der mvEC mit Fremdzellen.

Um die Primärkultur aufzureinigen wurde eine säulenbasierte magnetische Zellisolierung mit Microbeads angewendet. Damit die Zellen gelöst und vereinzelt werden konnten, kam es während der Aufarbeitung der Spenderbiopsie zu einem 40-minütigen Verdau mit Trypsin. Die Anwendung von Trypsin stellt jedoch einen Störfaktor für den Zeitpunkt der MACS Anwendung dar. Im Rahmen ihrer Arbeit zur protektiven Funktion der extrazellulären Proteoglykanmatrix zeigten Wu et al., dass eine ausgedehnte Trypsinisierung (12 min) die Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls β 1-Integrin und gegebenenfalls auch weiterer Adhäsionsmoleküle mit sich bringt (Wu et al., 2005). Trypsin schädigt, je nach Dauer, neben den interzellulären Proteinen auch zelluläre, membrangebundene Proteine. Dies hat Einfluss auf Zellvitalität, -phänotyp und -funktion. Da der Primärantikörper zur MACS Aufreinigung mit dem Oberflächenmarker CD31 gekoppelt ist, schließt sich eine Aufreinigung direkt nach der Endothelzellisolation an. Marelli-Berg et al. bestätigten eine Trypsinsensibilität von CD31, indem sie an murinen Endothelzellen eine Trypsin-bedingte Proteolyse von CD31 nachweisen konnten (Marelli-Berg et al., 2000). Diese Tatsache wurde durch das Ergebnis in Abb. 15, der FACS Messung frisch isolierter Zellen aus einer Spenderbiopsie, bestätigt. Abb. 15 B zeigt, dass auf nur 1,29 % der gewonnenen mvEC nach der Isolation aus einer Hautbiopsie der Oberflächenmarker CD31 exprimiert und gebunden werden konnte. Die mvEC aus der Dermis des Spendertiers wurden somit in Kultur gebracht und expandiert bis der Oberflächenmarker CD31 wieder nachweisbar war. Anschließend fand eine magnetische Aufreinigung mit Microbeads während der ersten und ggf. zweiten Passage mit dem Erfolg einer annähernd reinen Endothelzellkultur statt (Abb. 21). Der hohe Anteil an CD31-positiven Endothelzellen während der Passagen zeigte, dass durch eine fünfminütige Trypsinierung, um die Zellen aus ihrem Monolayer herauszulösen, kein gravierender Verlust von CD31 vorliegen konnte.

Im Verlauf der Zellkultivierung verschiedener Experimente wurde unterschiedlich oft die MACS Aufreinigung angewendet (Abb. 19). McDouall et al. beschreiben, dass eine erneute Aufreinigung der Kultur nötig wird, sobald Nicht-Endothelzellen eindeutig zu erkennen sind (McDouall et al., 1996). Werden jene Zellen belassen, überwachsen diese die Endothelzellen und wirken einem überwiegenden Endothelzellwachstum entgegen. Durch einen zusätzlichen zweiten MACS Schritt konnte somit in den Experimenten III und IV eine weitere Reinheitssteigerung auf 98,0 % und 95,2 % erzielt werden. Außerdem wurde festgestellt, dass mit jeder erfolgten MACS Aufreinigung eine initiale Reinheit von mindestens 99,0 % in der jeweiligen Passage erreicht werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass eine kleine Menge an Fremdzellen (≤ 1 %) ausreichend ist, um im weiteren Kultivierungsverlauf die Reinheit der Zellkultur zu mindern. In den Experimenten III und IV kam es im Vergleich zu den Experimenten I und II zu einer zweiten magnetischen Aufreinigung mit Microbeads. In diesem Zusammenhang müsste geklärt werden inwieweit eine erneute Aufreinigung der Zellkultur einen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten, die Adhäsionseigenschaften und den Differenzierungsgrad der Endothelzellen ausübt.

Damit die mvEC weniger Stress ausgesetzt werden, wäre als Alternative eine indirekte Aufreinigung der Zellkultur, eine Negativselektion, mit Microbeads möglich. Dazu müsste ein Antikörper eingesetzt werden, der sämtliche unerwünschten Zellen bindet und aus der Endothelzellkultur entfernt. Da für diese Methode der Aufreinigung eindeutig geklärt sein muss, um welche Fremdzellen es sich handelt und sich dies nicht realisieren ließ, wurde die Positivselektion in dieser Arbeit bevorzugt. Somit konnten gezielt nur die gewünschten mvEC für eine weitere Kultivierung selektiert werden.

Protokolle zur Isolation von mvEC aus der Haut des Menschen wurden bereits mit Erfolg etabliert (Kress et al., 2018). Vorgehensweisen zur Aufarbeitung der Spenderhaut und Kultivierung der mvEC wurden auf das Schwein adaptiert. Es kam jedoch trotz einer Behandlung mit Versene gegen vorhandene Fibroblasten während der Subkultivierung zu einer stärkeren Kontamination mit Fremdzellen im Vergleich zur humanen Endothelzellkultur. Im Protokoll der Isolation von mvEC aus humaner Haut konnte auf eine MACS Aufreinigung verzichtet werden. Abb. 16 zeigt Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD31 und Anti-Alpha Actin. Die kontaminierenden Fremdzellen zeigten gegen Anti-Alpha Actin ein eindeutiges positives, grünes Fluoreszenzsignal. Eine mögliche

Ursache für eine größere Kontamination mit Fremdzellen könnte das Vorhandensein der Musculi arrectores pilorum sein. Der Musculus arrector pili ist ein kleiner glatter Muskel, befindet sich in der Dermis und ist zuständig für die Piloerektion der Haare. Khiao In et al. zeigten, dass sich mit $91,9 \pm 27,0$ Musculi arrectores pilorum/cm² mehr dieser Muskeln am Bauch (Flanke) des Schweines als am Bauch des Menschen mit $13,1 \pm 3,4$ Musculi arrectores pilorum/cm² befinden (Khiao In et al., 2019). Am Rücken des Schweines sind sogar $161,0 \pm 48,0$ Musculi arrectores pilorum/cm² zu finden. Entsprechend könnten aus einer Hautbiopsie des Schweines mehr glatte Muskeln als aus einer Hautbiopsie des Menschen isoliert, die Endothelzellkultur kontaminiert und durch den Antikörper Anti-Alpha Actin detektiert werden.

Weitere Quellen zur Endothelzellausbeute von Spendern für die regenerative Medizin bieten die Isolierung aus dem Fettgewebe (Festa et al., 2023), aus dem Blut isolierte endotheliale Progenitorzellen (EPC) (Peters, 2018) oder die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs), die aus Blutzellen oder Fibroblasten stammen (Kennedy et al., 2021). Eine bestehende Herausforderung liegt darin, festzustellen, inwieweit diese Endothelzellen die Funktion ausgereifter primärer Endothelzellen widerspiegeln.

5.2 Herstellung des autologen Blasenaugmentats

Zur Herstellung eines autologen Blasenaugmentats, der UroVaSc, wurden die mvEC in eine azellularisierte Matrix eingebracht und für zwei Wochen in einem Bioreaktorsystem kultiviert. Die Besiedlung der Gefäßmatrix mit Zellen soll die BioVaSc-Gefäßstruktur mechanisch stärken, die Entstehung von Thromben verhindern, die Narbenbildung und eine nachfolgende Schrumpfung des Augmentats verringern und eine Abstoßungsreaktion des Empfängers nach erfolgter Augmentation abwenden (Caione et al., 2012) (Schaefer et al., 2013).

5.2.1 Bioreaktor- und Inkubator-technologie

Mit Bioreaktoren in einem Inkubator werden in-vitro-Voraussetzungen erzeugt, um ein mit Zellen besiedeltes Gerüst zu einem vitalen, dreidimensionalen Gewebe heranreifen zu lassen. In solchen Systemen werden die entsprechenden in-vivo-Bedingungen nachgestellt. Es gibt Bioreaktoren in verschiedensten Ausführungen wie z.B. Spinnerflasks, Perfusionsbioreaktoren, Kompressionsreaktoren, Dehnungsreaktoren oder

Bioreaktoren mit Zugspannung (Castro et al., 2020). In dieser Arbeit lag ein Schwerpunkt auf der Entwicklung eines dreidimensionalen, vaskularisierten Gewebes, um die Problematik der Minderperfusion bisheriger Blasenaugmentate zu umgehen. Nachdem die mvEC in das Gefäßsystem der BioVaSc eingebracht wurden, ist für die Entwicklung eines vaskularisierten Augmentats die Perfusion dieser Gefäße entscheidend. Diese Voraussetzung konnte durch ein von Hansmann entwickeltem System realisiert werden. Hansmann entwickelte Inkubatoren mit einem Temperatursensor, einem CO²-Konzentrationssensor und integrierten Rollerpumpen (Hansmann et al., 2013). Es wurden die Druckverhältnisse innerhalb einer zuführenden Arterie simuliert, um eine physiologische Perfusion der Gefäße innerhalb der BioVaSc zu ermöglichen. Eine peristaltische Pumpe erzeugte den Fluss des Kulturmediums in eine Druckflasche. In dieser baute sich ein Druckgradient auf, der einen Mediumfluss in das Gefäßsystem der BioVaSc erzeugte. Ein Luftpolster in der Druckflasche ermöglichte ein langsames Ansteigen des Drucks und glich gleichzeitig auftretende Druckunregelmäßigkeiten aus. Am arteriellen Zugang lag ein Drucksensor an, der die Pumpgeschwindigkeit regelte und sinusförmige Druckkurven zwischen 80 und 120 mmHg generierte. Durch dieses Bioreaktorsystem wurden die mvEC in den Gefäßen dauerhaft mit Sauerstoff und Zellkulturmedium versorgt und parallel biomechanischen Reizen ausgesetzt. Ein natürlicher Blutfluss wurde simuliert indem die Gefäßstrukturen der BioVaSc unter pulsatilem Fluss perfundiert wurden. Die mvEC wurden dabei einer konstanten Scherbeanspruchung ausgesetzt. Scherstress ist essentiell für die kardiovaskuläre Entwicklung, das Ausbilden neuer Kapillaren durch Angiogenese und führt, im Unterschied zu statisch wachsenden Endothelzellen, zu morphologischen Änderungen (Sturtzel, 2017). Die mvEC reagieren sowohl auf die Stärke der Druckstimulation, als auch auf die Strömungsart. Konstanter, laminarer Scherstress induziert eine Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus und eine verminderte Proliferation der Zellen. Turbulenter Scherstress führt zu einer erhöhten Proliferation der Zellen (Davies et al., 1986). In diesem Zusammenhang ist die Einhaltung der Homöostase von großer Bedeutung.

Kritisch zu hinterfragen sind die aufgetretenen Druckabweichungen während dem Besiedlungsprozess der BioVaSc in den Experimenten III und IV (Abb. 26). Hier entstanden Unregelmäßigkeiten des Drucks mit einem enormen Anstieg der Amplitude.

Das regulierende Luftpolster in der Druckflasche reduzierte sich soweit, bis die Flasche ausschließlich mit Kulturmedium gefüllt war. Die BioVaSc wurde einem erhöhten Druck ausgesetzt, bis die Unregelmäßigkeit im System manuell behoben wurde. Als Folge kam es in beiden Experimenten beim Nachweis der Gefäßdurchgängigkeit mit Phenolrot zu Schäden im Gewebe der BioVaSc. In Experiment III wurde der arterielle Zufluss geschädigt, denn das Phenolrot floss bereits im proximalen Teil des Mesenteriums in die Petrischale. Dies lässt auf eine Verletzung im Bereich des Gefäßknotens schließen. In Experiment IV kam es zu Verletzungen eines oder mehrerer Gefäße im Lumenbereich mit anschließendem Austritt des Phenolrots in die Petrischale. In beiden Experimenten war kein geschlossener Gefäßkreislauf mehr gegeben.

Eine mögliche Ursache stellen technische Mängel dar. Es kann zu Problemen des Inkubators wie Ausfällen, Druck- und/oder Temperaturabweichungen kommen. Undichtigkeiten im Bioreaktorsystem, in Form von Lockerungen der Flaschenverschlüsse oder austretendem Medium, stellen eine weitere Gefahrenquelle dar. Die Überwachung der relevanten Parameter wie Druck, Temperatur und Kohlenstoffdioxidgehalt ist über einen integrierten Monitor bereits gegeben, eine automatische Alarmbereitschaft und Gegenregulierung des Inkubators bei der Überschreitung wichtiger Parameter könnte im Fall von Abweichungen entstehende Gefäßverletzungen verhindern und ist für eine hohe und gleichbleibende Produktqualität zwingend zu fordern.

Eine weitere Ursache wäre das in den Bioreaktor eingebrachte Material. Es kann zu Veränderungen im Kapillarsystem der BioVaSc durch ein unregelmäßiges Wachstum der mvEC oder zum Verschluss von Gefäßen durch ein zu starkes Wachstum oder Ablösen der Zellen kommen. Ein zu starkes Wachstum der mvEC könnte mit der fehlenden Ko-Kultur mit in vivo auftretenden Zellen, wie z.B. Pericyten, in Verbindung stehen. Damit verbunden ist das Ausbleiben von Signalen zum kontrollierten Wachstum (Su et al., 2021). Kommt es zu einem Gefäßverschluss fehlt der Scherstress der Endothelzellen und eine ausreichende metabolische Versorgung der Zellen wird gefährdet. Durch das Verlegen von Gefäßen ändern sich die Druckverhältnisse in den intakten Gefäßen der BioVaSc. Dies führt zu Überbelastungen und anschließend zum Entstehen von Gefäßverletzungen. Gefäßverschlüsse können außerdem durch den Verlust der Adhäsionseigenschaften der mvEC bedingt werden. Da noch nicht hinreichend geklärt

wurde, ob es in der zweiwöchigen Besiedlungsphase zum Verlegen von Gefäßästen kommt, wäre es in der weiteren Prozessentwicklung erforderlich, zum Versorgungsstadium der BioVaSc eine Inprozesskontrolle zu etablieren. Der Fluidstrom kann schon durch kleine Veränderungen in der Lage der Arterie oder Vene beeinflusst werden. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung eines unter GMP erlaubten, nicht zelltoxischen und intensiven Farbstoffes in der Zellsuspension und dem zirkulierenden Kulturmedium, damit ein Verlegen der Gefäße rechtzeitig erkannt werden kann und manipulative Maßnahmen durchgeführt werden können.

Die Aufarbeitung und Anwendung tierischen Gewebes für die regenerative Medizin ist anspruchsvoll und die Gewährleistung mechanischer Langzeitstabilität wurde noch nicht ausreichend geklärt. Problematisch sind zudem die unsichere Qualität aufgrund der großen Variabilität zwischen den Spendertieren sowie religiöse und ethische Aspekte. Alternative Scaffoldmaterialien könnte das 3D-Druckverfahren bieten. Als Ersatz für beschädigtes oder verlorenes Körpergewebe lassen sich individuell maßgeschneiderte Implantate ausdrucken, deren Zusammensetzung sich optimal an die Anforderungen und die Umgebung anpassen lässt. Die Materialien und 3D-Druckmethoden müssen jedoch sehr hohe medizinische Anforderungen erfüllen und stellen somit bisher noch keine neuwertige Versorgungsmöglichkeit dar, entwickeln sich jedoch auf Grund vielversprechender Erfolge zu einer ernstzunehmenden Technologie (Lam et al., 2023).

5.3 Qualitätskontrollen im Herstellungsprozess

Die Sicherheit des Patienten steht an höchster Stelle und soll u.a. durch eine gleichbleibende Qualität des Produktes gewährleistet werden. Um direkte Auswirkungen auf die Sicherheit des Empfängers durch Produktabweichungen zu vermeiden, muss in hohem Maße auf die Qualität geachtet, diese kontrolliert und ggf. angepasst werden.

5.3.1 Charakterisierung der Endothelzellen

Ein wichtiges Zwischenprodukt im Herstellungsprozess der UroVaSc stellen die aus Schweinehaut isolierten, primären mvEC dar, die vorbereitend für die Besiedlung einer BioVaSc kultiviert und vermehrt wurden. Um einen hohen Qualitätsstandard erfüllen zu können, wurden die Parameter Morphologie, Reinheit und Mikrobiologie der mvEC überprüft. Ein Protokoll zur Qualitätskontrolle der Zellkultur mit den Anforderungen der jeweiligen Faktoren wurde erstellt und in Tab. 21 dargestellt. Die Charakterisierung der

gewonnenen mvEC erfolgte über den Nachweis des exprimierten endothelialen Oberflächenproteins CD31. Aufgrund seiner hohen Endothelzellspezifität ist der Marker CD31 bei der Isolierung und Charakterisierung von Endothelzellen der am häufigsten angewandte Marker. Wie bereits beschrieben wurde, besitzt CD31 eine Sensitivität gegenüber Trypsin. In den Experimenten konnte jedoch durch den hohen Anteil an CD31-positiven Endothelzellen gezeigt werden, dass eine fünfminütige Trypsinierung zum Herauslösen der Zellen aus ihrem Monolayer keinen gravierenden negativen Effekt auf das Oberflächenprotein CD31 auslöst und somit keinen nennenswerten Verlust von CD31 verursacht. Bei den Immunfluoreszenzfärbungen zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur stimmte der Anteil CD31-positiver Zellen nahezu mit dem Anteil von von-Willebrandfaktor-positiver Zellen überein. Der vWF eignet sich prinzipiell gut als Endothelzellmarker, jedoch unterliegt die Expression des Faktors einer Variationsbreite, die eine Bewertung erschwert. Senis et al. beschreiben die eingeschränkte Aussagekraft des vWFs. Ihre Beobachtungen zeigten, dass sich die Expression des vWFs in der Rattenaorta von Zelle zu Zelle unterscheidet (Senis et al., 1996). In den Experimenten dieser Arbeit spiegelt sich diese Varianz der vWF-Expression wider. Der Anteil vWF-positiver Zellen stimmte mit den Ergebnissen der Färbungen gegen CD31 überein, die Intensität des Fluoreszenzsignals variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Zellen. Die CD31-markierten Zellen zeigten die konstanteste, deutlichste und intensivste Fluoreszenz. Insgesamt erweist sich somit CD31 als ein verlässlicher Endothelzellmarker. Zur weiterreichenden Charakterisierung der mvEC könnte der Nachweis zusätzlich durch CD54, CD73, CD102, CD105 oder CD106 erfolgen.

Die untersuchten Parameter in der Qualitätskontrolle charakterisieren die mvEC. Neben diesen phänotypischen Kontrollen sollten Tests zur Überprüfung der funktionellen Eigenschaften der mvEC durchgeführt werden. Primäre mvEC stellen ein kritisches Zwischenprodukt im Herstellungsprozess dar. Sie sind an der Ausbildung neuer Gefäße beteiligt und somit für die Reendothelialisierung und erfolgreiche Funktion der BioVaSc als Blasenaugmentat essentiell. Ein wichtiger Prozess der Angiogenese ist die Ausbildung von luminären, verzweigten Zellformationen bzw. Gefäßen in-vivo. In-vitro kann die angiogene Aktivität primärer mvEC durch den Tube Formation Assay (Staton et al., 2009) oder den Sprouting Assay (Tetzlaff & Fischer, 2018) nachgewiesen werden. Die

Fähigkeit der Adhäsion, Migration, Differenzierung und der Zusammenschluss der Zellen könnte mit Hilfe dieser Methoden überprüft werden.

5.3.2 Freigabe der UroVaSc

Nach erfolgter zweiwöchiger Kultur einer mit mvEC rebesiedelten BioVaSc wird das Gewebe aus dem Bioreaktorsystem entnommen. Nach der Kontrolle bestimmter Parameter anhand des in Tab. 23 aufgeführten Freigabeprotokolls kann die hergestellte UroVaSc für die Augmentation in einen Empfänger eingesetzt werden. Neben den Inprozesskontrollen Morphologie, Gefäßdruck, Temperatur, CO²-Gehalt und Mikrobiologie wurden die Gefäßdurchgängigkeit mit Phenolrot, die metabolische Aktivität der mvEC mit MTT, sowie das Vorhandensein und die Art von Zelltypen mit Immunhistochemischen-, Immunfluoreszenz-, Feulgen-, und HE-Färbungen am Gewebe kontrolliert. Die Beurteilung von Tissue-Engineering-Produkten erfolgt erst am Ende des Herstellungsprozesses mit Hilfe etablierter zellbiologischer Methoden. Letztere Kontrollen verletzen das besiedelte Augmentat. Für die anschließende Anwendung des Verfahrens im Großtierversuch bzw. am Patienten müssen die Methoden zur Freigabe und Qualitätskontrolle der UroVaSc nichtinvasiv sein, damit dem Empfänger ein unversehrtes Augmentat implantiert werden kann. Nichtinvasive Methoden, wie die Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase Konzentration im Medium mit Hilfe des LDH-Assay, geben Aufschluss über die Stoffwechselaktivität des Gewebes beziehungsweise über die Zellviabilität. Je höher der Grad einer Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Medium (Kabakov & Gabai, 2018). Die Medienproben während der Kultur würden jedoch durch das Vorhandensein von Zellen in den Glasgefäßen des Bioreaktors verfälscht werden. Auf die mvEC speziell in der BioVaSc könnte so kein Rückschluss gezogen werden. Die zeitgleiche Herstellung eines zweiten Produktes ausschließlich zur Durchführung von Qualitätskontrollen würde eine Ausweitung auf invasive Verfahren ermöglichen. Da es sich jedoch auf Grund der Individualität der Ausgangs- und Zwischenprodukte nicht um identische Endprodukte handelt ist ein Heranziehen der Freigabekriterien einer Kontroll-UroVaSc in Bezug auf die Patientensicherheit wiederum mit Unsicherheiten versehen.

Ein weiteres sicherheitsrelevantes Risiko im Bereich der Qualitätskontrolle der UroVaSc ist die Übertragung von tierischen Viren auf den Empfänger des Implantats. Bei xenogenen Transplantationen, der Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder

Organen zwischen Individuen verschiedener Spezies, ist dieses Thema von sehr großer Bedeutung. Die Richtlinie der Europäischen Kommission vom 14. September 2009 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel im Hinblick auf Arzneimittel für neuartige Therapien beschreibt die Notwendigkeit bei zellbasierten Arzneimitteln auf die damit verbundenen besonderen Sicherheitsbedenken, wie die Übertragung xenogener Erreger auf den Menschen, einzugehen (2009/120/EC). In dieser Arbeit steht eine Übertragung porciner endogener Retroviren (PERV) zur Diskussion. Hierbei gibt es mit PERV-A, PERV-B und PERV-C drei Klassen. Eine Übertragung des porcinen Retrovirus von porcinen, apoptotischen Zellen auf humane Zellen ist jedoch sehr unwahrscheinlich und wird durch verschiedene Studien bestätigt ((Hermida-Prieto et al., 2007) (Di Nicuolo et al., 2005). Es wurden bereits Schritte wie die Spülung des porcinen Jejunums mit Natriumdesoxycholat und das Gammasterilisationsverfahren zur Verhinderung einer Virusanreicherung eingeführt. Eine Anreicherungsstudie zur Validierung der Virussicherheit sollte jedoch in Zukunft der Zulassungsbehörde vorgelegt werden können. Bereits klinisch eingesetzte Verfahren wie der Herzklappen- (Kavarana et al., 2022) oder Aortenwurzelersatz (Sweeney et al., 2021) aus porcinem Ausgangsmaterial bestätigen den bedenkenlosen Einsatz porciner dezellularisierter Gewebe in der regenerativen Medizin.

6 Zusammenfassung

Die regenerative Medizin gewinnt heutzutage immer mehr an Bedeutung. Der klinische Ersatz der Harnblase nach Tumoren oder bei Fehlbildungen stellt bis heute einen komplexen Eingriff mit zahlreichen Langzeitkomplikationen dar. Trotz etlicher Behandlungsmöglichkeiten können die aktuellen therapeutischen Maßnahmen nicht als langfristige Heilung angesehen werden. Meine Arbeit ist Teil einer präklinischen Großtierstudie zur Entwicklung eines neuartigen Blasenersatzes auf der Basis eines vaskularisierten Tissue-Engineering-Konstruktes. Mit der Herstellung eines vaskularisierten Augmentats (UroVaSc) wird ein Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP) für die Anwendung am Menschen entwickelt.

Unter Zuhilfenahme fortschrittlicher Verfahren aus dem Bereich des Tissue Engineerings wird ein Gewebe hergestellt, welches im Empfänger die beiden kritischen Punkte der Vernarbung und insbesondere bei jungen Empfängern die Problematik eines nicht mitwachsenden Gewebes reduzieren oder verhindern soll. Als Ausgangsmaterialien dienen ein Abschnitt porcinen Jejunums und eine porcine Hautbiopsie. In der klinischen Anwendung wird die Hautbiopsie dem Empfänger des Augmentats entnommen. Aus den beiden Ausgangsmaterialien werden als Zwischenprodukte dezellularisiertes Jejunum (BioVaSc) und aus der Hautbiopsie eine primäre, mikrovaskuläre Endothelzellkultur (mvEC) hergestellt. Die mvEC besiedeln die Gefäße der Trägerstruktur BioVaSc in einem Bioreaktorsystem und führen zum vaskularisierten Endprodukt, der UroVaSc.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines dreidimensionalen, vaskularisierten Blasenaugmentats. Im Verlauf dieser Arbeit waren die Methoden der Isolation und Kultivierung der Zellen, die Rebesiedlung und Kultur des autologen Augmentats, als auch die Qualitätskontrolle unter den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis zu etablieren.

Für die Isolierung der mvEC wurde ein Protokoll erarbeitet, mit dem sich die Zellen, trotz intraindividuelle Unterschiede der Spendertiere, in ausreichender Zellzahl und Reinheit darstellen ließen. Des Weiteren wurde die endotheliale Rebesiedlung der Trägerstruktur erfolgreich durchgeführt und dies mit Hilfe zellbiologischer und immunhistologischer Methoden belegt. In der Risikobeurteilung des Herstellungsprozesses wurde die

Zusammenfassung

Überwachung des Inkubators als wichtigen Schritt zur Erhöhung der Produktqualität identifiziert, der in weiterführenden Arbeiten adressiert werden sollte. Auf Grundlage meiner Forschungsergebnisse und weiterer Forschungsarbeiten erfolgt derzeit die funktionale Testung des Endproduktes im Großtierversuch.

Mit der erfolgreichen Herstellung eines vaskularisierten Blasenaugmentats wird betroffenen Patienten eine neuartige Therapieoption eröffnet, welche die Aussicht auf eine Heilung schwerer Erkrankungen an der Blase ermöglicht.

7 Summary

Regenerative medicine is becoming increasingly important nowadays. The clinical replacement of the urinary bladder after tumors or in cases of malformations has so far been a serious procedure with many long-term problems. Although there are diverse treatment options, the current therapeutic measures cannot be considered a permanent cure. My work is part of a preclinical animal study to develop a novel bladder replacement based on a vascularized tissue-engineered construct. The manufacturing of a vascularized bladder replacement (UroVaSc) will develop an advanced therapy medical product (ATMP) for human use.

Using innovative tissue engineering techniques, a tissue is produced that is intended to reduce or prevent the two critical points of scarring in the recipient and, especially in young recipients, the problem of tissue that does not grow with the recipient. The raw material is a section of porcine jejunum and a porcine skin biopsy. In clinical use, the skin biopsy is taken from the recipient. Out of the two starting materials, the intermediates vascularized porcine jejunum (BioVaSc) and a primary, microvascular endothelial cell culture (mvEC) isolated from the porcine skin biopsy are prepared. The mvEC colonize the vessels of the BioVaSc in a bioreactor system, leading to the final product, UroVaSc.

The aim of the study was to create a three-dimensional vascularized bladder augmentation. In the course of this work, the methods of isolation and cultivation of the cells, the re-colonization and culture of the autologous augmentation product, as well as the quality control under the guidelines of Good Manufacturing Practice had to be established.

For the isolation of the mvEC, a protocol was developed that, despite intra-individual differences of the donor animals, allows the reproduction of cells in sufficient cell count and purity. Furthermore, the endothelial recolonization of the carrier structure was successfully executed and this was proven with the help of cell biological and immunohistological methods. In the area of quality control, the monitoring of the incubator was identified as an important step to increase product quality, which should be addressed in further work. Based on my research results and further research work, the functional testing of the final product in animal experiments is currently being performed.

Summary

The successfully produced vascularized bladder replacement introduces a novel therapeutic option for affected patients, offering the prospect of a cure for severe diseases of the bladder.

8 Literaturverzeichnis

- Amirsadeghi, A., Jafari, A., Eggermont, L. J., Hashemi, S. S., Bencherif, S. A., & Khorram, M. (2020). Vascularization strategies for skin tissue engineering. *Biomater Sci*, 8(15), 4073-4094. <https://doi.org/10.1039/d0bm00266f>
- Ahlmann, A. H., Fang, S., Mortensen, S. B., Andersen, L. W., Pedersen, P. G., Callesen, J. J., Bak, S. T., Lambertsen, K. L., Andersen, D. C. (2021). Decellularised Human Umbilical Artery as a Vascular Graft Elicits Minimal Pro-Inflammatory Host Response Ex Vivo and In Vivo. *Int J Mol Sci*, 22(15), 7981. <https://doi.org/10.3390/ijms22157981>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00156-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00156-8)
- Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-Jahromi, S., & Ziraksaz, Z. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 33(2), 144-172. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1430464>
- Basini, G., Falasconi, I., Bussolati, S., Grolli, S., Ramoni, R., & Grasselli, F. (2014). Isolation of endothelial cells and pericytes from swine corpus luteum. *Domest Anim Endocrinol*, 48, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.02.007>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2, 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Caione, P., Boldrini, R., Salerno, A., & Nappo, S. G. (2012). Bladder augmentation using acellular collagen biomatrix: a pilot experience in exstrophic patients. *Pediatr Surg Int*, 28(4), 421-428. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3063-0>
- Castro, N., Ribeiro, S., Fernandes, M. M., Ribeiro, C., Cardoso, V., Correia, V., Minguez, R., & Lanceros-Mendez, S. (2020). Physically Active Bioreactors for Tissue Engineering Applications. *Adv Biosyst*, 4(10), e2000125. <https://doi.org/10.1002/adbi.202000125>
- Davies, P. F., Remuzzi, A., Gordon, E. J., Dewey, C. F., Jr., & Gimbrone, M. A., Jr. (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(7), 2114-2117. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.7.2114>
- Deutsche Stiftung Organtransplantation. (2022). *DSO Jahresbericht*. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Retrieved August 03 from <https://www.dso.de/organspende/statistiken-berichte/jahresbericht>

- Di Nicuolo, G., van de Kerkhove, M. P., Hoekstra, R., Beld, M. G., Amoroso, P., Battisti, S., Starace, M., di Florio, E., Scuderi, V., Scala, S., Bracco, A., Mancini, A., Chamuleau, R. A., & Calise, F. (2005). No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver. *Xenotransplantation*, *12*(4), 286-292. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00226.x>
- European Commission. (2017). *EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. Good Manufacturing Practice. Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products*. Retrieved August 23 from https://health.ec.europa.eu/system/files/2017-11/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps_0.pdf
- Festa, J., AlZaim, I., Kalucka, J. (2023). Adipose tissue endothelial cells: insights into their heterogeneity and functional diversity. *Curr Opin Genet Dev*, *81*, 102055. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2023.102055>
- Fodor, W. L. (2003). Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *1*(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-102>
- Gould, R. A., & Butcher, J. T. (2010). Isolation of valvular endothelial cells. *J Vis Exp*(46). <https://doi.org/10.3791/2158>
- 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. <https://doi.org/10.1002/biot.201200162>
- Hätinen, O. A., Lähtenvuo, J. E., Korpela, H. J., Pajula, J. J., & Ylä-Herttuala, S. (2019). Isolation of fresh endothelial cells from porcine heart for cardiovascular studies: a new fast protocol suitable for genomic, transcriptomic and cell biology studies. *BMC Mol Cell Biol*, *20*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0215-2>
- Hermida-Prieto, M., Domenech, N., Moscoso, I., Diaz, T., Ishii, J., Salomon, D. R., & Mañez, R. (2007). Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus (PERV) to transplant recipients and abattoir workers in contact with pigs. *Transplantation*, *84*(4), 548-550. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000275203.91841.23>
- Jamiolkowski, R. M., Kang, S. D., Rodriguez, A. K., Haseltine, J. M., Galinat, L. J., Jantzen, A. E., Carlon, T. A., Darrabie, M. D., Arciniegas, A. J., Mantilla, J. G., Haley, N. R., Noviani, M., Allen, J. D., Stabler, T. V., Frederiksen, J. W., Alzate, O., Keil, L. G., Liu, S., Lin, F. H., . . . Achneck, H. E. (2015). Increased yield of endothelial cells from peripheral blood for cell therapies and tissue engineering. *Regen Med*, *10*(4), 447-460. <https://doi.org/10.2217/rme.15.2>
- Kabakov, A. E., & Gabai, V. L. (2018). Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol Biol*, *1709*, 107-127. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9

- Kavarana, S., Kwon, J. H., Zilinskas, K., Kang, L., Turek, J. W., Mohiuddin, M. M., Rajab, T. K. (2022). Recent advances in porcine cardiac xenotransplantation: from aortic valve replacement to heart transplantation. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 20(8), 597-608. <http://doi.org/10.1080/14779072.2022.2100760>
- Kennedy, C. C., Brown, E. E., Abutaleb, N. O., Truskey, G. A. (2021). Development and Application of Endothelial Cells Derived From Pluripotent Stem Cells in Microphysiological Systems Models. *Front Cardiovasc Med*, 8, 625016. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.625016>
- Khiao In, M., Richardson, K. C., Loewa, A., Hedtrich, S., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2019). Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anat Histol Embryol*, 48(3), 207-217. <https://doi.org/10.1111/ahc.12425>
- Klagsbrun, M., & D'Amore, P. A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*, 53, 217-239. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.53.030191.001245>
- Kress, S., Baur, J., Otto, C., Burkard, N., Braspenning, J., Walles, H., Nickel, J., & Metzger, M. (2018). Evaluation of a Miniaturized Biologically Vascularized Scaffold in vitro and in vivo. *Sci Rep*, 8(1), 4719. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22688-w>
- Kwon, H., Brown, W. E., Lee, C. A., Wang, D., Paschos, N., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2019). Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol*, 15(9), 550-570. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0255-1>
- Lam, E. H. Y., Yu, F., Zhu, S., Wang, Z. (2023). 3D Bioprinting for Next-Generation Personalized Medicine. *Int J Mol Sci*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076357>
- Langer, S., Radtke, C., Györi, E., Springer, A., & Metzelder, M. L. (2019). Bladder augmentation in children: current problems and experimental strategies for reconstruction. *Wien Med Wochenschr*, 169(3-4), 61-70. <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0645-z>
- Lee, H., & Kang, K. T. (2018). Advanced tube formation assay using human endothelial colony forming cells for in vitro evaluation of angiogenesis. *Korean J Physiol Pharmacol*, 22(6), 705-712. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.6.705>
- Marelli-Berg, F. M., Peek, E., Lidington, E. A., Stauss, H. J., & Lechler, R. I. (2000). Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods*, 244(1-2), 205-215. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00258-1](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00258-1)
- McDouall, R. M., Yacoub, M., & Rose, M. L. (1996). Isolation, culture, and characterisation of MHC class II-positive microvascular endothelial cells from the

- human heart. *Microvasc Res*, 51(2), 137-152.
<https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0016>
- Meezan, E., Hjelle, J. T., Brendel, K., & Carlson, E. C. (1975). A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci*, 17(11), 1721-1732.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(75\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(75)90119-8)
- Obermayr, F., Szavay, P., Schaefer, J., & Fuchs, J. (2011). Outcome of augmentation cystoplasty and bladder substitution in a pediatric age group. *Eur J Pediatr Surg*, 21(2), 116-119. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1267223>
- Olson, J. L., Atala, A., & Yoo, J. J. (2011). Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J*, 47(1), 1-13.
<https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1>
- Parlakpinar, H., & Gunata, M. (2021). Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 43(6), 651-665. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1966033>
- Patabendige, A., & Abbott, N. J. (2014). Primary porcine brain microvessel endothelial cell isolation and culture. *Curr Protoc Neurosci*, 69, 3.27.21-17.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0327s69>
- Peters, E. B. (2018). Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng Part B Rev*, 24(1), 1-24.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2017.0127>
- Plendl, J., Neumüller, C., Vollmar, A., Auerbach, R., & Sinowatz, F. (1996). Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anat Embryol (Berl)*, 194(5), 445-456. <https://doi.org/10.1007/bf00185992>
- Schaefer, F.-M., & Stehr, M. (2018). Tissue engineering in pediatric urology – a critical appraisal. *Innov Surg Sc*.
- Schaefer, M., Kaiser, A., Stehr, M., & Beyer, H. J. (2013). Bladder augmentation with small intestinal submucosa leads to unsatisfactory long-term results. *J Pediatr Urol*, 9(6 Pt A), 878-883. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2012.12.001>
- Schultheiss, D., Gabouev, A. I., Cebotari, S., Tudorache, I., Walles, T., Schlote, N., Wefer, J., Kaufmann, P. M., Haverich, A., Jonas, U., Stief, C. G., & Mertsching, H. (2005). Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol*, 173(1), 276-280. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000145882.80339.18>
- Senis, Y. A., Richardson, M., Tinlin, S., Maurice, D. H., & Giles, A. R. (1996). Changes in the pattern of distribution of von Willebrand factor in rat aortic endothelial cells following thrombin generation in vivo. *Br J Haematol*, 93(1), 195-203.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.4661005.x>

- Staton, C. A., Reed, M. W., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*, *90*(3), 195-221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x>
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*, *1003*, 71-91. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4
- Su, H., Cantrell, A. C., Zeng, H., Zhu, S. H., & Chen, J. X. (2021). Emerging Role of Pericytes and Their Secretome in the Heart. *Cells*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/cells10030548>
- Sweeney, J. C., Smith, S. A., Avula, D., Trivedi, J. R., Slaughter, M. S., Ganzel, B. L. (2021). Aortic root replacement with Medtronic Freestyle bioprosthesis: 25-year experience. *J Card Surg*, *26*(11), 4038-4042. <http://doi.org/10.1111/jocs.15910>
- Tetzlaff, F., & Fischer, A. (2018). Human Endothelial Cell Spheroid-based Sprouting Angiogenesis Assay in Collagen. *Bio Protoc*, *8*(17), e2995. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2995>
- Wu, Y., Wu, J., Lee, D. Y., Yee, A., Cao, L., Zhang, Y., Kiani, C., & Yang, B. B. (2005). Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol*, *24*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.11.007>
- Young, C., Jarrell, B. E., Hoying, J. B., & Williams, S. K. (1992). A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. *Cell Transplant*, *1*(4), 293-298. <https://doi.org/10.1177/096368979200100406>
- Young, L., Sung, J., Stacey, G. et al. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc*, *5*(5), 929–934. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>
- Ziegele, B., & Müller, A. (2012). *Arzneimittel für neuartige Therapien ATMP - Advanced therapy medicinal products. Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise.* Paul-Ehrlich-Institut. Retrieved August 23 from https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/beratung/innovationsbuero/broschuere-atmp.pdf?__blob=publicationFile&v=4
- (2001) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. OJ L311:67–126.
- (2007) Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. OJ L324:121–137.
- (2009) COMMISSION DIRECTIVE 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products. OJ L242/3

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATMP	Advanced therapies medicinal products
BioVaSc	Biological Vascularized Scaffold – dezellularisiertes Jejunum (BioVaSc-TERM [®])
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DLR	Deutsche Landrasse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	Das heißt
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum
ggf.	Gegebenfalls
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Stunde
Heinsberg	Heinrichs Tierzucht GmbH
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
i.d.R.	In der Regel
IF	Immunfluoreszenz
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
H ₂ O	Wasser

l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MACS	Magnetic activated cell sorting
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute
mind.	Mindestens
Mio	Millionen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mvEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen
NaCl	Natriumchlorid
P	Passage
PET	Polyethylenterephthalat
PBS ⁻	Phosphat-Buffered-Saline
PBS ⁺	Phosphat-Buffered-Saline mit Kalzium und Magnesium
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
SIS	Small Intestinal Submucosa
SOP	Standard Operating Procedure
Tab.	Tabelle
Tiernr.	Tiernummer
u.a.	Unter anderem
UroVaSc	Mit Endothelzellen rebesiedeltes dezellularisiertes Schweinejejunum
VE-Wasser	Voll Entionisiertes Wasser
vWF	Von Willebrand Faktor
z.B.	Zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	10
Abbildung 2 Makroskopische Aufnahmen des Azellularisierungsvorgangs im Reinraum.	23
Abbildung 3 Entnahmestelle der Hautbiopsie am Spenderschwein. Eine spindelförmige 14 cm ² große Hautbiopsie (rot) wurde am unteren Bauchbereich des Spenderschweins entnommen und in PBS ⁻ und 1 % Anti-Anti gelagert.	24
Abbildung 4 Makroskopische Aufnahmen der Aufbereitungsschritte der Schweinehaut zur Endothelzellisolierung.....	25
Abbildung 5 Makroskopische Aufnahme der MACS Multistand Säule.....	28
Abbildung 6 Schema zur Lokalisation der fünf Aufnahmebereiche auf einer gefärbten Wellplatte.....	31
Abbildung 7 Makroskopische Aufnahmen der Besiedlung des Gefäßsystems einer BioVaSc.....	32
Abbildung 8 Makroskopische Aufnahmen des Inkubatorwagens und Bioreaktorsystems während der Besiedlung einer BioVaSc mit Endothelzellen.....	33
Abbildung 9 Makroskopische Aufnahmen des Fortschritts der Schablonenherstellung.	41
Abbildung 10 Zellzahl der isolierten Endothelzellen zum Vergleich der Entnahmeorte am Spenderschwein.	42
Abbildung 11 Zellzahl und Vitalität der isolierten Endothelzellen aus Hautbiopsien unterschiedlicher Spenderschweine.....	43
Abbildung 12 Vergleich der Lebendzellausbeute aus entnommenen Hautbiopsien mit unterschiedlichen Lagerzeiten.	44
Abbildung 13 Vergleich der Totzellausbeute aus entnommenen Hautbiopsien mit unterschiedlichen Lagerzeiten.	45
Abbildung 14 Mikroskopische Aufnahmen einer Mischkultur aus Endothelzellen und Zellen vom myofibroblastären Typ zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	46
Abbildung 15 Durchflusszytometrische Analyse der primären Endothelzellen aus einer Hautbiopsie, Passage 0.	47
Abbildung 16 Reinheitskontrolle der Endothelzellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung mit Microbeads.	48

Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse der Endothelzellkultur vor und nach einer Microbeads-Aufreinigung gegen CD31, Passage 1.....	49
Abbildung 18 Makroskopische Aufnahmen der Endothelzellen in Kultur, Passage 2.	50
Abbildung 19 Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahlen der Endothelzellkulturen in den Besiedlungsexperimenten I, II, III und IV über eine maximale Dauer von 45 Tagen....	51
Abbildung 20 Mikroskopische Aufnahmen der Erfolgskontrolle einer Versenebehandlung der Endothelzellkultur, Passage 1.....	53
Abbildung 21 Reinheitsbestimmung (in %) der Endothelzellkultur der Besiedlungsexperimente I, II, III und IV mittels Durchflusszytometrie während verschiedener Subkultivierungen.	54
Abbildung 22 Reinheitsbestimmung (in %) der finalen Passage der Endothelzellkultur vor einer BioVaSc Besiedlung.	55
Abbildung 23 Mikroskopische Aufnahmen zur Reinheitsbestimmung der finalen Endothelzellpassage des ersten Besiedlungsexperiments mittels einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 (rot) und Anti-Alpha Actin (grün).	56
Abbildung 24 Menge der Endothelzellausbeute für die Besiedlung einer BioVaSc an Besiedlungstag I und II.....	57
Abbildung 25 Druckverläufe einer zweiwöchigen BioVaSc-Besiedlung in Sekunden und mmHG im Bioreaktorsystem.....	58
Abbildung 26 Ausschnitt des Druckverlaufs in Sekunden und mmHg der Experimente III (grün) und IV (lila) mit Unregelmäßigkeiten in der Amplitude.	59
Abbildung 27 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B74.	61
Abbildung 28 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B71.	63
Abbildung 29 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B90.	65
Abbildung 30 Qualitätskontrollen UroVaSc GMP B86.	66

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete porcine Ausgangsgewebe, BioVaSc Vorrat	12
Tabelle 2 Verwendetes biologisches Material, Hautbiopsien Schweineoperation	12
Tabelle 3 Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	13
Tabelle 4 Verwendete Puffer und Lösungen	14
Tabelle 5 Verwendete Antikörper.....	14
Tabelle 6 Verwendete Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie.....	15
Tabelle 7 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 8 Verwendete Laborgeräte	17
Tabelle 9 Verwendete Software.....	19
Tabelle 10 Verwendete Bioreaktortechnik	19
Tabelle 11 Qualitätsbewertung einer mit Phenolrotlösung angespülten BioVaSc nach der Dezellularisierung.....	22
Tabelle 12 Entnahmeprotokoll der Hautbiopsie am Spenderschwein	24
Tabelle 13 Schematische Darstellung der Wellplattenbelegung	30
Tabelle 14 Paraffineinbettung.....	34
Tabelle 15 Entparaffinieren	35
Tabelle 16 HE-Färbung	36
Tabelle 17 Feulgen Färbung	37
Tabelle 18 Immunhistologie	37
Tabelle 19 Immunfluoreszenz.....	38
Tabelle 20 Ergebnisse der Endotoxin- und Mykoplasmenmessung.....	67
Tabelle 21 GMP konformes Freigabeprotokoll für primäre mikrovaskuläre Endothelzellen	67
Tabelle 22 GMP konformes Freigabeprotokoll	69
Tabelle 23 GMP konformes Freigabeprotokoll der Endoproduktes UroVaSc.....	70

IV. Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Oliver Pullig für das Ermöglichen meiner Promotion mit diesem Dissertationsthema. Vielen Dank für die Hilfestellung bei Unklarheiten im Rahmen der Erstellung der Arbeit und für die Begutachtung.

Weiterhin vielen Dank an Herrn Dr. habil. Marco Metzger und Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Gutachter.

Ein besonderer Dank gilt Heidi Linß, Mona Röschlau und Kirsten Langenbrink für die freundliche Unterstützung bei Fragestellungen im Labor und den Versuchsdurchführungen.

Danken möchte ich außerdem dem Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz in Würzburg und den Operateuren der BioVaSc für die Durchführung der Entnahmen am Tier und der Bereitstellung der notwendigen Jejunum- und Hautsegmente.

Ein großer Dank gilt der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die Förderung des „UroVaSc“ Projekts sowie den Antragstellern Herrn Dr. habil. Marco Metzger aus Würzburg und Herrn Dr. med. Frank-Mattias Schäfer aus Nürnberg.

Danke an alle Kollegen des Lehrstuhls Tissue Engineering und Regenerative Medizin für die hilfsbereite und nette Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei Fragestellungen im Rahmen der Versuchsdurchführungen.

Meiner Familie möchte ich ebenfalls danken für den großen Rückhalt und die viele Unterstützung die ihr mir jederzeit zukommen lasst. Ich bin euch sehr dankbar, dass ihr immer für mich da seid und hinter mir steht. Laurin möchte ich für die stetige Motivation und Korrektur meiner Arbeit danken. Danke, dass du an meiner Seite bist.

Danke