

Entwicklung eines bioartifiziellen Rekonstruktionsgewebes für die Luftröhrenchirurgie und Umsetzung in einen GMP-Prozess

Development of a bioartificial tissue for reconstruction of the trachea and
its implementation in a GMP process

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dipl. Biol. (t.o.) Iris Dally
(Vor- und Familienname)

Esslingen am Neckar
(Geburtsort)

Würzburg, 2013



Eingereicht am: 10.12.2013

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Th. Schmitt

Gutachter : Frau Prof. Dr. Heike Walles

Gutachter: Herr Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 14.05.14

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Teilaspekte dieser Arbeit wurden in folgenden Journalen veröffentlicht:

Mertsching, H. Schanz, J. Steger, V. Schandar, M. Schenk, M. Hansmann, J. **Dally**, I. Friedel, G. Walles, T.

Generation and autologes Implantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue

Autologes Implantation 2009; 88(2): 203-210

PMID: 19623015

geteilte Erstautorenschaft:

Scheller K, **Dally**, I, Hartmann N, Münt B, Braspenning J, Walles H

Upcyte@Microvascular Endothelial Cells Repopulate Decellularized Scaffold

Tissue Eng Part C Methods 2012 Sep 13

PMID: 22799502

Teilaspekte dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

4th BioStar 2010, 13-15.10.2010 Stuttgart, Deutschland

Poster: *In vitro* development of a vascularised tracheal patch to restore airway defects after resection

Termis EU 2011, 7. - 10. Juni Granada, Spanien

Poster: Bioartificial tissue for the surgical reconstruction of tracheal lesions

WCRM 2011, 2. - 4.11. Leipzig, Deutschland

Vortrag: Reconstruction of tracheal lesions by bioartificial tissue –from R&D to GMP-

WITE 2012, 23 - 25.5. 2012, Würzburg, Deutschland

Vortrag: From R&D to GMP – Development of a tracheal patch

Teilaspekte dieser Arbeit wurden in der Sendung SternTV – die Reportage ausgestrahlt:

Samstag, 17.3.2012 20.15 - 24.00 Uhr

Zusammenfassung

Schwere Verletzungen der Luftröhre (Trachea) durch beispielsweise Tumore, Unfälle oder Verätzungen können zu einer Öffnung des Brustraums und zu einem Einströmen der Atemluft führen, was schwere Infektionen nach sich ziehen kann. Des Weiteren kann es zur Aspiration über den Defekt kommen, was schwere Lungenentzündungen mit oft tödlichem Ausgang hervorruft. Zur operativen Behandlung kann circa 1/3 der Trachea entfernt, der Rest gelockert und wieder vernäht werden. Auch Stunts oder Tubes stehen für die Behandlung zur Verfügung. Für eine kleine Gruppe von Patienten sind diese Maßnahmen aber nicht ausreichend, da ihre Verletzungen beispielsweise zu großflächig sind. Für diese Patienten wird im Rahmen der sogenannten Regenerativen Medizin nach Lösungen gesucht.

Für den Einsatz am Patienten im Rahmen von klinischen Studien müssen die Regeln und Gesetze der guten Herstellungspraxis (**good manufacturing practise = GMP**) umgesetzt und eingehalten werden. Hierdurch ist die Produktion von hoher Qualität gewährleistet und somit die Sicherheit des Patienten erhöht.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines vaskularisierten, autologen Implantats zur Behandlung von schweren Verletzungen der Trachea im Umfeld der guten Herstellungspraxis. Die Matrix besteht aus einem circa 14 cm langen Stück porcinen, azellularisierten Dünndarm, welches mit dem zuführenden Arterien- und Venenpaar frei präpariert und BioVaSc (**B**iological **V**ascularized **S**caffold) genannt wird. Dieses wird dann mit isolierten und kultivierten Zellen des Patienten besiedelt und reift für zwei Wochen in einem speziell hierfür entwickelten Bioreaktorsystem. Danach erfolgt die Analyse bzw. die Implantation in den Patienten.

Zur Überprüfung der Integrität der Gefäße des nativen Ausgangsmaterials ist eine definierte Menge PBS durch die Arterie eingeleitet und der venöse Rückfluss bestimmt worden. Als Qualitätskriterium galt hierbei ein Rückfluss von 50%. Im Anschluss erfolgten die Azellularisierung der BioVaSc zur Entfernung der porcinen Zellen und der enzymatische Abbau der DNS, unter Erhalt des natürlichen Gefäßsystems. Zur Entfernung der porcinen Zellen ist Natriumdesoxycholat verwendet worden, wobei Rückstände davon das Ansiedeln der autologen Zellen negativ beeinflussen könnten. Deshalb wurde ein Test etabliert, mit dessen Hilfe, das

Auswaschen der Azellularisierungsdetergenz bis zur Sterilisation nachweisbar war. Des Weiteren könnten in der BioVaSc natürlicherweise enthaltene Endotoxine Immunreaktionen im späteren Empfänger auslösen. Die gesetzlichen Grenzwerte hierzu betragen $<0,5$ EU/ml und konnten durch Modifikationen des Protokolls erreicht werden. Zur Etablierung des GMP-Prozess war es außerdem notwendig, die zur Azellularisierung verwendeten Reagenzien soweit wie möglich auf speziell für das GMP zertifizierte umzustellen. Durch Modifikation des Protokolls konnte histologisch eine weitgehende DNS- und Zellfreiheit erzielt werden, in der quantitativen Analyse ergab sich eine Abreicherung von 97% im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Zur Bestimmung der funktionellen Stabilität der azellularisierten Matrix wurde die maximal tolerable Zugspannung bestimmt, wobei sich zeigte, dass die Degeneration der BioVaSc erst bei 60°C für 1,5 Tage zu starken Veränderungen in der Reißfestigkeit führt. Bei einer Lagertemperatur von 4°C waren bei einer Lagerdauer von 24 - 253 Tagen keine gravierenden Unterschiede ermittelbar. Somit ist die Haltbarkeit auf 3 Monate festgelegt worden, da in diesem Zeitraum nicht mit Veränderungen der Stabilität für die chirurgische Anwendung zu rechnen ist.

Zur Besiedlung der Gefäße der Matrix wurden mikrovaskuläre Endothelzellen und für das Lumen Fibroblasten und Skelettmuskelzellen verwendet. Die Protokolle sind hierzu unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis etabliert, optimiert und mit, soweit möglich, zertifizierten Reagenzien durchgeführt worden. Zur genauen Charakterisierung der Zellen wurden diese immunhistologisch über vier Passagen charakterisiert, wobei sich unterschiedliche Expressionsmuster ergaben. Zur Charakterisierung der Endothelzellen ist die Färbung gegen CD31 und den vWF etabliert worden. Die Färbung gegen CD31 ist zur Identitätsfindung gut geeignet und wird von der ersten Passage von den Zellen exprimiert, wohingegen der vWF Spender abhängig starke Unterschiede in der Expression aufwies. Bei den Fibroblasten waren Kollagen 1 und der Prolyl-4-hydroxylase-Enzymkomplex über vier Passagen analysierbar. Hierbei wurde Kollagen 1 von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, wohingegen der Enzymkomplex nur bei circa 1/3 der Zellen nachweisbar war. Eine Kreuzreaktivität der Fibroblasten auf die verwendeten Muskelzellmarker war nicht ersichtlich. Die Muskelzellen wachsen aus Satellitenzellen aus, somit ist die Findung geeigneter Marker sehr schwierig, da sich die Zellen alle in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden. Dies zeigte sich auch bei der

immunhistologischen Analyse mit den Antikörpern gegen Desmin, Myogenin, Myosin und MyoD. Diese Proteine wurden von den Muskelzellen je nach Differenzierungsstadium gebildet, wohingegen der Prolyl-4-hydroxylase-Enzymkomplex und Kollagen 1 in ähnlichem Maße sowohl bei den Skelettmuskelzellen als auch bei den Fibroblasten nachweisbar war.

Zur Herstellung des autologen Implantats wurden zunächst die mikrovaskulären Endothelzellen in das vorhandene Gefäßsystem der BioVaSc eingebracht und dann für sieben Tage im etablierten Bioreaktorsystem kultiviert. Danach erfolgte die Besiedlung mit Skelettmuskelzellen und Fibroblasten und die weitere siebentägige Kultur im Bioreaktorsystem.

Die Besiedlung des Gefäßsystems musste optimiert werden, um sowohl die Besiedlungsdichte zu steigern als auch die Effizienz zu erhöhen. Das angedachte Verfahren besiedelte das Gefäßsystem der BioVaSc mit einer Spritze, hierbei war die Beladung sehr gering, da ein Großteil der Zellen nicht in der BioVaSc adhärierte. Die Umstellung auf einen konstanten Fluidstrom mit Hilfe des Infusomators führte zu einer verbesserten Effizienz und in Kombination mit einer erhöhten Zellzahl zu einer deutlichen Erhöhung der Besiedlungsdichte. Das Lumen konnte mit der etablierten Methode vollständig besiedelt werden, wobei allerdings die histologische Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Skelettmuskelzellen nicht möglich ist, da keine entsprechender zellspezifischer Marker etabliert werden konnten. Nach vierzehntägiger Kultur im Bioreaktorsystem erfolgte die Kontrolle der Zellvitalität mit Hilfe von MTT, mit welchem sowohl in den Gefäßstrukturen als auch im Lumen der BioVaSc vitale Zellen nachweisbar waren. Histologische Analysen zeigten, dass die mikrovaskulären Endothelzellen in den verbliebenen vaskulären Strukturen CD31 und den vWF exprimieren.

Zusätzlich wurde die BioVaSc mit upcyte mvEC der Firma Medicyte besiedelt. Diese transfizierten Zellen sind hochproliferativ und bilden endothelspezifische Marker aus. Mit ihnen konnte das Gefäßsystem der BioVaSc mit hochproliferativen Zellen besiedelt werden. Nach der vierzehntägigen Kultur im Bioreaktorsystem waren die Zellen sowohl in den Gefäßstrukturen als auch im Lumen und im Bindegewebe nachweisbar. Die Lebend/Tot-Färbung zeigt genauso wie MTT vitale Zellen innerhalb der Gefäßstrukturen. In der histologischen Analyse konnte die Ausbildung von CD31,

eNOS und vWF nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die Matrix mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt, um zu analysieren, ob die Scherkräfte die Ausbildung endothelialer Marker stimulieren können. Die Isolation von Stammzellen ist schon lange erprobt und wäre für den Patienten mit wenigen und bekannten Risiken verbunden. Außerdem wäre mit einer Isolation eine große Zellzahl erreichbar. Nach vierzehntägiger Kultur konnte in den histologischen Analysen keine Ausbildung von CD31 oder dem vWF gefunden, mit MTT allerdings vitale Zellen nachgewiesen werden.

Die Kultur des autologen Transplantats erfolgt in Bioreaktoren und den dazugehörigen Inkubatorwagen. Der Inkubatorwagen hält die Temperatur und Gaszusammensetzung aufrecht und sorgt mit den eingebauten Pumpen für die Übertragung des Fluidstroms in die vaskulären Strukturen der BioVaSc. Die mikrovaskulären Endothelzellen werden so durch die entstehenden Scherkräfte stimuliert, wohingegen die Fibroblasten und Skelettmuskelzellen ohne Belastung im Lumen wachsen. Die benötigten Bioreaktoren und der entsprechende Inkubatorwagen mussten für die Bedingungen des GMP weiterentwickelt werden. Er erhielt zwei voneinander unabhängige Pumpsysteme, eine möglichst einfache Bedienoberfläche, eine verbesserte Reinigungs- und Desinfizierbarkeit sowie die Erfassung der Daten von Druck, Temperatur und Kohlenstoffdioxid. Für diese Prozessgrößen wurde eine Regelung etabliert, da eine einfache Steuerung die durch das biologische Material auftretenden Störungen nicht ausgleichen kann.

Summary

Severe damage of the windpipe (trachea) caused by injuries such as tumors, accidents or chemical burn can lead to an opening of the trachea to the chest followed by an influx of air, often causing serious infections. Furthermore, aspiration via the defect can result in a fatal pneumonia. Surgical intervention is limited to 1/3 of trachea, which can be removed, loosened and re-sutured. Stents or tubes can be sutured into the trachea for extension or structural support. For a small group of patients, these procedures are not sufficient because their injuries are too large. Solutions for these patients are being explored in the field of regenerative medicine. In order to transplant ex vivo produced cells or tissues into patients in clinical studies, the rules and laws of good manufacturing practice (GMP) have to be followed, as the quality of the produced product helps to ensure the safety and efficacy of the treatment for the patient.

In this work, a vascularized implant for the treatment for tracheal defects was developed according to GMP standards. For this purpose, a part of porcine small intestine with a feeding artery and vein was prepared, decellularized and sterilized. The remaining matrix, trademarked BioVaSc “Biological, Vascularized Scaffold”, was colonized with isolated and cultured cells from the patient and then matured for two weeks in a bioreactor system. Finally, the prepared for implantation autologous implant was extensively characterized.

To check the integrity of the vessel system before the subsequent procedures, flow through the BioVaSc was verified. For this purpose, a defined amount of PBS was introduced through the artery and venous return was then ascertained. Only BioVaScs with a venous return higher than 50% are taken into the decellularization process, which is performed by removing the porcine cells with sodium desoxycholat and enzymatic degradation of the residual DNA. As traces of sodium desoxycholat could negatively affect the seeding of the autologous cells, a test was established to demonstrate the depletion of sodium desoxycholat to acceptable traces in the final matrix preparation. Furthermore, the porcine starting material for the BioVaSc contains endotoxins, which could trigger immune reactions in the recipient if not efficiently removed. The legal limit for endotoxine levels in pharmaceutical products is set at <0.5 EU / ml and could be achieved through modifications of the protocol. In order to establish a GMP compliant process, specially certified chemicals were used

wherever possible. The protocol was optimized until histological analysis showed only few residual cells and DNA residues. The quantitative DNA analysis revealed a decrease of 97 % of the initial DNA content. To determine storage stability, a tensile test to check elasticity of the BioVaSc was established. The analysis shows that only the incubation of the BioVaSc at 60 ° C for 1.5 days leads to significant degradation and changes in durability of the matrix. When stored at 4 ° C for a period of 24-253 days, no significant differences could be identified, so storage for at least 3 months at 4° C should be feasible.

To colonize the matrix, autologous microvascular endothelial cells, fibroblasts and skeletal muscle cells were used. The protocols were established under GMP conditions, were further optimized and, wherever possible, certified reagents were used. For accurate characterization of these cells, immunohistology analyses were performed at each of the four passages for all cell types. For the characterization of endothelial cells, staining identifying CD31 and vWF was used. Staining identifying CD31 is very homogeneous and well-suited to identify endothelial cells, whereas expression of vWF factor highly depends on the donor. On fibroblasts, collagen 1 and the prolyl-4-hydroxylase enzyme complex were tested with antibodies. Collagen 1 was expressed by approximately 2/3 of the cells, whereas the enzyme complex was formed only by about 1/3 of the cells. Cross-reactivity of fibroblasts with the muscle cell markers was not detectable. Muscle cells were isolated from satellite cells at varying differentiation stages and displaying different surface markers. This was shown in a broad immunohistochemical analysis with antibodies identifying desmin, myogenin, myosin, and MyoD. Collagen 1 was generated by almost all muscle cells, whereas the prolyl 4-hydroxylase enzyme complex, a special marker for fibroblasts, was detectable in 40% (average over 4 passages) of the skeletal muscle cells.

For the final manufacturing of the autologous implant, microvascular endothelial cells were introduced into the vascular system of the BioVaSc and were cultured for seven days in a custom made bioreactor system under defined shear stress conditions resembling the human blood pressure. This was followed by culturing of skeletal muscle cells and fibroblasts in the lumen of the gut, followed by an additional seven-day culture period. Colonization of the vascular system had to be optimized in order to increase the population density as well as the efficiency of reseeded. The envisaged method was to reseed the remaining vascular structures of the BioVaSc

with a syringe; in this case, the efficiency was very low because the majority of cells didn't adhere. Switching to a constant fluid flow by using a syringe pump led to an improved reseeding efficiency. Additionally, increasing cell numbers showed a significant improvement in population density. The lumen was fully populated with fibroblasts and skeletal muscle cells by the established protocol. However, the discrimination between fibroblasts and skeletal muscle cells with normal histology was difficult because no fitting antibody was available. After a two-week culture in the custom made bioreactor system, the cell vitality was checked using MTT. The analysis showed vital cells in the vascular structures and in the lumen of the BioVaSc. Endothelial cells in the remaining vascular structure displayed CD31 and vWF shown by histological analyses.

In order to explore alternative cell sources, the BioVaSc was reseeded with upcyte mvEC. These transfected cells are highly proliferative and show typical endothelial markers. The BioVaSc vascular structure was colonized three times. After fourteen days of culture in the bioreactor system, cells could be detected in vascular structures, lumen and in connective tissue. Live / dead staining and MTT identified vital cells within vascular structures. The histological analysis revealed expression of CD31, eNOS and vWF.

Furthermore, the matrix was reseeded with mesenchymal stem cells; to test if shear stress triggers differentiation into endothelial like cells. This was checked through displaying the corresponding endothelial markers in histological analyses. Mesenchymal stem cells are used in clinical studies and would be a known and low risk for use in patients. With one extraction, a large number of cells could be attained. After fourteen days of culture in the bioreactor system, histological analyzes show no expression of CD31 or vWF factor. With MTT, vital cells could be detected. A further differentiation of cells could possibly be caused by the use of appropriate media or a longer culture period.

Culture and maturation of autologous implants are performed in bioreactors and related incubators. The custom-made incubator maintains the temperature, gas composition and pulsatile fluid flow through the vascular structures of the BioVaSc. Microvascular endothelial cells are stimulated by the resulting shear stress, while fibroblasts and skeletal muscle cells are cultured without any flow in the lumen.

Required bioreactors and related incubators were developed according to GMP requirements. It comprised two independent pumping systems, uncomplicated user interface, an improved cleaning and disinfection options, as well as the documentation of data, such as pressure, temperature and carbon dioxide.

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Heike Walles für die Bereitstellung meines Themas, die Diskussionen und Hilfestellungen.

Prof. Georg Krohne für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Prof. Thomas Hirth für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit am Fraunhofer IGB und die Korrektur meiner Arbeit.

Dr. Martin Funk für die Korrektur meiner Arbeit und die vielen Ideen, die er eingebracht hat.

Markus Schandar für die Korrektur meiner Arbeit und sowohl ihm als auch **Kirstin Linke** für die Einführung in das Thema GMP und ihre Hilfestellung in allen Belangen.

Dr. Johanna Schanz für die Korrektur meiner Arbeit und für alle Tipps und Tricks.

Silvia Kolbus-Hernandez, Nele Jenne, Karin Mester und **Ann-Kathrin Kapfer** für ihre Hilfe im Labor, die gute Stimmung während der Arbeit, das Einlernen in die Geräte und Protokolle und für 1000 Kleinigkeiten, die einem das Leben erleichtern.

Dr. Martin Schenk für die Durchführung der Schweine-OP's und seine Begeisterung für die stetige Verbesserung der BioVaSc's.

Dr. Jan Hansmann und seiner Arbeitsgruppe insbesondere **Alexander Kahlig** für die Hilfe bei der Bioreaktortechnik.

Prof. Thorsten Walles, Andrea Hofbauer und dem **Team Schillerhöhe** für die beständige Versorgung mit Biopsien.

Dr. Ziegler für die beständige Versorgung mit Biopsien.

Dr. Anke Hoppensack und **Florian Groeber** für die vielen Tipps und Tricks und die Hilfestellungen beim LSM.

Katharina Scheller für die gute Zusammenarbeit beim Schreiben des Papers und für das zur Verfügung stellen „ihre“ upcyte mvEC.

Simon Dally für die Hilfe und alle angeregten Diskussionen und dem Rest meiner **Familie** für den Glauben an meine Fähigkeiten und die Mithilfe bei der Finanzierung meines Studiums.

Der **Max-Buchner-Forschungsstiftung** für ihr Stipendium für Materialkosten.

Dem **BMBF** für die Förderung des Projektes.

Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Die Dissertation ist weder, vollständig oder in Teilen, schon einmal bei einer anderen Fakultät vorgelegt worden, um einen akademischen Grad zu erwerben.

Ich darf den akademischen Grad einer Diplom Biologin (technisch orientiert) führen.

Ein akademischer Grad ist mir noch nie entzogen oder ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren bzw. ein Disziplinarverfahren eingeleitet worden.

Stuttgart, den

(Iris Dally)

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AKF	Antikörperfärbung
ATMP	Advanced therapies medicinal products
BioVaSc	Biological Vascularized Scaffold
BR	Bioreaktor
CD	Cluster of Differentiation
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
FCS	Fetal calf serum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H&E	Hämatoxilin - Eosin
H ₂ O	Wasser
HRP	horseradish peroxidase - Merrettichperoxidase
M	Molar
mM	millimolar
min	Minute
Mio	Millionen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mvEC	mikrovaskuläre Endothelzellen
NaCl	Natriumchlorid
OT	Objektträger
P	Passage
PBS-	Phosphat-Buffered-Saline
PBS+	Phosphat-Buffered-Saline mit Kalzium und Magnesium
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SIS	Small Intestinal Submucosa
SOP	Standard Operating Procedure = Standardvorgehensweise

VE-Wasser Voll Entionisiertes Wasser
vWF von Willebrand Faktor
z.B. zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

<i>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</i>	I
<i>Zusammenfassung</i>	II
<i>Summary</i>	VI
<i>Danksagung</i>	X
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	XI
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	XII
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	XIV
<i>Tabellenverzeichnis</i>	XVIII
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	XIX
1. Einleitung.....	22
1.1 <i>Regenerative Medizin</i>	22
1.2 <i>Ursache und Behandlung von trachealen Defekten</i>	23
1.3 <i>Rekonstruktion der Trachea</i>	27
1.4 <i>Matrices in der Regenerativen Medizin</i>	29
1.5 <i>Zellquellen in der Regenerativen Medizin</i>	31
1.6 <i>Reaktorsysteme für die Implantatherstellung</i>	32
1.7 <i>Anforderungen an die Produktion von Arzneimitteln für neuartige Therapien nach der guten Herstellungspraxis</i>	33
1.8 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	39
2. Materialien	43
2.1 <i>Xenogenes Material und Biopsiematerial</i>	43
2.1.1 <i>Lösungen für die Azellularisierung</i>	43
2.2 <i>Reagenzien für die Zellkultur</i>	44
2.1.3 <i>Reaktortechnik</i>	44
2.4.0 <i>Testkits und Farbstoffe</i>	45
2.4.1 <i>Lösungen für die Histologie</i>	45
2.5.2 <i>Lösungen für die Antikörperfärbung</i>	46
2.5.3 <i>Antikörper</i>	46

2.6 Verbrauchsmaterial	47
2.7 Geräte	47
3. Methoden.....	49
3.1 Herstellung der Matrix	49
3.1.1 Entnahme der biologisch vaskularisierten Matrix.....	49
3.1.2 Bestimmung des maximalen Durchflusses	49
3.1.3 Azellularisierung der biologisch vaskularisierten Matrix	50
3.2 Zellkultur	53
3.2.1 Isolation der Zellen.....	53
3.2.1.1 Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen aus adulter Haut.....	53
3.2.1.2 Isolation der Fibroblasten aus humaner, adulter Haut.....	54
3.2.1.3 Isolation der Muskelzellen aus humanem Muskelgewebe	55
3.2.1.4 Mesenchymale Stammzellen	55
3.2.1.5 Upcyte mvEC	55
3.2.2 Subkultivierung der Zellen.....	56
3.2.3 Zellzahlbestimmung	56
3.3 Herstellung eines vaskularisierten, autologen Implantats	56
3.3.1 Besiedlung und Kultur der Matrix	57
3.3.1.1 Besiedlung des Gefäßsystems.....	58
3.3.1.2 Besiedlung der luminalen Seite.....	59
3.4 Nachweismethoden zur Qualitätskontrolle	60
3.4.1 Histologie	60
3.4.1.1 Herstellung und Vorbereitung der Proben.....	61
3.4.1.2 Hämalaun/Eosin Färbung	62
3.4.1.3 Immunhistologie	63
3.4.1.4 Auszählung der Zellkulturen.....	66
3.4.1.5 DNS-Färbung nach Feulgen	66
3.4.2 Spezielle Nachweise zur Analyse der Matrix nach der Azellularisierung ..	67
3.4.2.1 Endotoxinmessung.....	67
3.4.2.2 Analyse des Azellularisierungsdetergenz.....	67
3.4.2.3 Bestimmung der funktionellen Stabilität	68

3.4.2.4 DNS-Analysen der azellularisierten Matrix	69
3.4.3 Spezielle Nachweise für die Zellaktivität	70
3.4.3.1 Nachweis der Endothelzellaktivität mit fluoreszierendem LDL	70
3.4.3.2 Lebend/Tot-Färbung	70
3.4.3.3 Nachweis der Zellvitalität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT).....	71
3.4.3.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	71
4. Ergebnisse.....	72
4.1 Herstellung der Matrix	72
4.1.1 Entnahme der Dünndarmsegmente	73
4.1.2 Azellularisierung.....	73
4.2 Qualitätskontrolle der biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc).....	73
4.2.1 Funktionsprüfung nach Entnahme	73
4.2.1.2 Prüfkriterien zur Eingangskontrolle	74
4.2.2 Nachweis der Reinheit der BioVaSc	75
4.2.2.1 Nachweis der Gallsäure	75
4.2.2.2 Nachweis der Reinheit über histologische Analysen und Bestimmung der Endotoxinwerte	77
4.2.2.3 DNS-Gehalt der Matrix.....	82
4.2.3 Identitätsprüfung der Matrix	83
4.2.4 Funktionelle Stabilität der Matrix	85
4.3 Herstellung der primären Zellkulturen	86
4.3.1 Isolation der Zellen aus Biopsien	87
4.3.2 Expansion der Zellen	87
4.4. Identitätskontrolle der Zellen	87
4.5 Herstellung des autologen Implantats	94
4.5.1 Effizienz der Beladung der Kapillarstrukturen	96
4.5.2 Besiedlung des Lumens des autologen Transplantats.....	97
4.6 Kultur des autologen Transplantats und technische Voraussetzungen.....	97
4.6.1 Bioreaktorsysteme und Inkubatorwagen	97
4.6.1.1 Bioreaktor zur Kultivierung der BioVaSc	97
4.6.1.2 Bioreaktoren unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis	98

4.6.2 Inkubatorwagen.....	99
4.6.2.1 1 Version des Inkubatorwagens	100
4.6.2.2 Zweite Version des Inkubatorwagens	104
4.7 Qualitätskontrolle des autologen Implantats	105
4.7.1 Nachweis der Besiedlung und der Zellvitalität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	105
4.7.2 Kontrolle der Zellvitalität und Gewebestruktur.....	106
4.7.2.1 Identitätskontrolle und Steigerung der Besiedlungseffizienz im Kapillarsystem.....	106
4.7.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	109
4.7.6.3 Identitätskontrolle der Zellen im Lumen des autologen Transplantats .	110
4.7.6.4 Durchfluss nach der zweiwöchigen Kultur im Bioreaktorsystem	111
4.8 Andere Zellquellen	112
4.8.1 Verwendung von upcyte mvEC.....	112
4.8.2 Verwendung mesenchymalen Stammzellen	115
5. Diskussion	117
5.1 Herstellung der biologisch vaskularisierten Matrix	118
5.2 Isolation und Kultivierung der humanen Zellen	123
5.3 Herstellung des autologen Implantats	125
5.4 Reaktortechnologie	129
5.6 Zusammenfassung.....	132
5.7 Ausblick.....	137
6. Literaturverzeichnis.....	138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einbettprogramm	61
Tabelle 2: Schritte der Entparaffinierung	62
Tabelle 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	63
Tabelle 4: Antikörperfärbung	65
Tabelle 5: DNS-Färbung nach Feulgen	66
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflussmessung	74
Tabelle 7: Zusammenfassung der Prüfkriterien bei der Eingangskontrolle	75
Tabelle 8: Abreicherung der Gallsäure in Prozent	77
Tabelle 9: Übersicht über die einzelnen Protokolle.....	78
Tabelle 10: Zusammenfassung der Azellularisierungsprotokolle	82
Tabelle 11: DNS-Gehalt der Matrix während der einzelnen Prozessschritte in Prozent	83
Tabelle 12: Verwendet Antikörper zur Charakterisierung der BioVaSc	84
Tabelle 13: Zur Färbung von Fibroblasten verwendete Antikörper	88
Tabelle 14 Für die Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen verwendete Antikörper	90
Tabelle 15 Zur Charakterisierung der Skelettmuskelzellen verwendete Antikörper..	92
Tabelle 16: Vergleich der Antikörperexpression von Fibroblasten und Skelettmuskelzellen	94
Tabelle 17 verwendete Antikörper	107
Tabelle 18: Verwendete Antikörper	110
Tabelle 19: Zur Charakterisierung der mit upcyte mvEC besiedelten Matrices verwendete Marker	114
Tabelle 20: verwendete Antikörper	115
Tabelle 21: Prozessschema der Matrix Herstellung	134
Tabelle 22 Prozessschema zur Isolation und Kultur der Zellen	135
Tabelle 23 Prozessschema zur Besiedlung und Kultur des autologen Implantats..	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Regenerativen Medizin.....	23
Abbildung 2: Anatomische Darstellung.....	24
Abbildung 3: Querschnitt der Trachea.....	24
Abbildung 4: Thorakostoma bei infizierter Resthöhle.....	26
Abbildung 5: Bronchoskopie des 2004 mit einem autolog besiedelten Patch behandelten Patienten.....	28
Abbildung 6: Biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc).....	30
Abbildung 7: H&E-Färbung.....	31
Abbildung 8: Bioreaktoren zur dynamischen Kultur von Zellen auf verschiedenen Matrices.....	32
Abbildung 9: Überblick über die gesetzliche Lage der ATMP´s in Deutschland.	35
Abbildung 10: Die Verantwortlichkeiten im GMP.....	38
Abbildung 11: Überblick über die Projektteile der Herstellung und Qualitätskontrolle.....	40
Abbildung 12: Implantat Herstellung.....	41
Abbildung 13: Die einzelnen Abschnitte des zu entwickelnden Prozesses.	42
Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Matrixherstellung.	51
Abbildung 15: Matrix Herstellung.....	52
Abbildung 16: Mit Phenolrot gespülte BioVaSc.....	57
Abbildung 17: Rebesiedlung der biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc)	58
Abbildung 18:Besiedlung des Implantats.....	58
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Elastizitätsmessung.....	69
Abbildung 20: Entnahme Stellen für Biopsien zur DNA Analyse an einer BioVaSc..	69
Abbildung 21: Prozessübersicht über die Azellularisierung.....	72
Abbildung 22: Auswaschen des zur Azellularisierung verwendeten Natriumdesoxycholats.....	76
Abbildung 23: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte auf nativem Schweinedarm.....	78
Abbildung 24: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem ersten Protokoll azelluarisierten Matrices.....	79
Abbildung 25: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem zweiten Protokoll azelluarisierten Matrices.....	79

Abbildung 26: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem dritten Protokoll	80
Abbildung 27: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem vierten Protokoll azellularisierten Matrices.....	81
Abbildung 28: Mittelwert des DNS-Gehalts von 1 mm ² Matrix an.....	83
Abbildung 29: Immunhistologie zur Charakterisierung der azellularisierten BioVaSc im Vergleich zum nativen porcinen Darm.	84
Abbildung 30: Ermittlung der funktionellen Stabilität der Matrix.....	86
Abbildung 31: Prozessschema zur Herstellung und Kultivierung der Zellkulturen	87
Abbildung 32: Immunhistologische Analyse auf vier Passagen Fibroblasten	89
Abbildung 33: Immunhistologische Färbung gegen die Marker CD31 und vWF	90
Abbildung 34: Aufnahme von Fluoreszenz markiertem LDL in mikrovaskulären Endothelzellen	91
Abbildung 35: Charakterisierung von Skelettmuskelzellen	93
Abbildung 36: Prozessschema zur Besiedlung und Kultur der BioVaSc mit primären Zellen.....	95
Abbildung 37: Steigerung der Beladungseffizienz.	96
Abbildung 38: Bioreaktorsystem zur Kultivierung der autolog besiedelten Implantats	98
Abbildung 39: Bioreaktoren für die gute Herstellungspraxis	99
Abbildung 41: Schematischer Aufbau des verwendeten Bioreaktorsystems und Darstellung der entsprechenden Regelung	101
Abbildung 42: Dokumentation der Temperatur innerhalb der Inkubator kammer	102
Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der Erholzeiten des CO ₂ -Gehalts.....	103
Abbildung 44: Druckverlauf von zwei Reaktoren über 14 Tage.....	104
Abbildung 45: Inkubatorwagen für die gute Herstellungspraxis	105
Abbildung 46: Das mit MTT behandelte autologe Implantat nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktor.	106
Abbildung 47: Antikörperfärbung gegen auf verschiedenen besiedelten BioVaSc	
Abbildung 48: REM Aufnahmen der Tela Submucosa einer mit mikrovaskulären Endothelzellen besiedelten Arterie	109
Abbildung 49: Antikörperfärbung von Paraffinschnitten der Darmwand	111
Abbildung 50: Lebend/Tot Färbung der mit upcyte mvEC besiedelten BioVaSc	113

Abbildung 51: (A) H&E Färbung eines Paraffinschnitt des Mesenteriums	114
Abbildung 52: Mit mesenchymalen Stammzellen besiedelte BioVaSc.	116

1. Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Die Fachrichtungen Zellbiologie, Gentherapie, Biomaterialien, Immunologie, Tissue Engineering und Ingenieurwesens werden in der Regenerativen Medizin vereint und auf ein breites Feld von klinischen Anforderungen angewendet. Zielsetzung ist die Entwicklung von biologischen Implantaten, welche geschädigte Gewebe reparieren, unterstützen oder erhalten sollen [1]. Implantate können biologischen oder künstlichen Ursprungs sein. Diese fallen, da sie keinen aktiven Wirkstoff enthalten, unter das Medizinproduktegesetz. Sobald sie mit allogenen oder autologen Zellen besiedelt sind, erhalten sie den „Wirkstoff“ Zelle und können damit in den Stoffwechsel eingreifen. In diesem Fall greift das Arzneimittelgesetz. Das Herstellungsverfahren und die Etablierung geeigneter Kulturbedingungen sind in diesen Fällen von wissenschaftlicher Bedeutung. Bei der Herstellung von Zell-Matrix-Implantaten werden die autologen Zellen aus Biopsiematerialien isoliert, im Labor expandiert und in eine Matrix eingebracht. Nach einigen Tagen bis Wochen der *ex vivo* Kultur ist das autologe Implantat soweit gereift, dass eine gewebeähnliche oder organoide Struktur entsteht, die nach Implantation eine Regeneration des geschädigten Gewebe oder Organs ermöglicht und eine Heilung unterstützt, wo dies zuvor aus Mangel an Struktur oder Funktionalität nicht möglich gewesen wäre. In Abbildung 1 wird die Implantat Herstellung schematisch dargestellt. Dabei erfolgt nach der Entnahme der Biopsie, die Isolation und Vermehrung der Zellen, das Einbringen der Selbigen in eine geeignete Matrix sowie deren Kultur. Nach der Reifung erfolgt dann die Implantation in den Patienten.

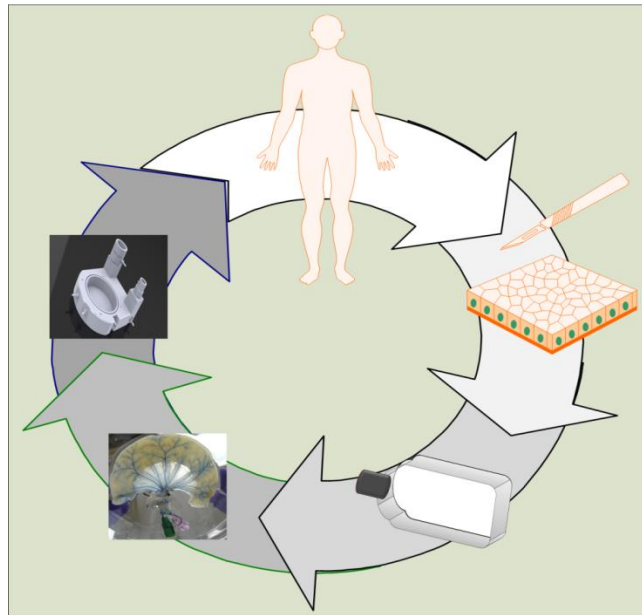


Abbildung 1: Schema der Regenerativen Medizin. Nach Entnahme der Biopsien erfolgen die Zellisolation, die Kultivierung und das Einbringen der Zellen in eine geeignete Matrix. Nach einer individuellen Reifungsphase erfolgt schließlich die Implantation.

Die adäquate Versorgung solcher artifiziellen Gewebeäquivalente mit Nährstoffen bzw. Sauerstoff stellt bei entsprechender Abmessung eine große Herausforderung dar [2]. Im Gegensatz zur allogenen Organtransplantation benötigen solche maßgeschneiderten Produkte der Regenerativen Medizin beispielsweise keine lebenslange Immunsuppression, so dass die Bildung von Infektionen vermieden werden kann. Im Bereich der Regenerativen Medizin ließen sich bisher zahlreiche Behandlungsfelder wie beispielsweise im Bereich der Blase [3], des Pankreas [4], der Leber [5], der Niere [6], der Herzklappen [7], der Haut [8] und der Wundheilung [9] sowie orthopädische Anwendungen [10] erschließen. Im nächsten Abschnitt werden die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten von Verletzungen der Luftröhre erörtert.

1.2 Ursache und Behandlung von trachealen Defekten

Die Luftröhre (Trachea) stellt die circa 9 - 14 cm lange Verbindung des Kehlkopfs zur Hauptbronchiengabel dar [11] und ist an der Reinigung, Befeuchtung und Erwärmung der Atemluft beteiligt. Sie teilt sich über die Hauptbronchien in die Lappenbronchien, Segmentbronchien, Bronchiolen und schließlich in die Bronchioli respiratorii. Sie liegt ventral der Speiseröhre und wird von 16 bis 20 hufeisenförmigen Spangen aus hyalinem Knorpel stabilisiert [11]. Diese halten das Lumen der Trachea gegen einen beim Einatmen entstehenden Unterdruck offen. Das Lumen wird durch die Pars membranacea mit dem Musculus trachealis abgeschlossen. Diese kann das

Lumen kontrahieren und somit verkleinern. Durch diese Verkleinerung des Querschnitts kann die Strömungsgeschwindigkeit erhöht und somit beispielsweise das Abhusten von Fremdkörpern erleichtert werden (Abbildung 2).

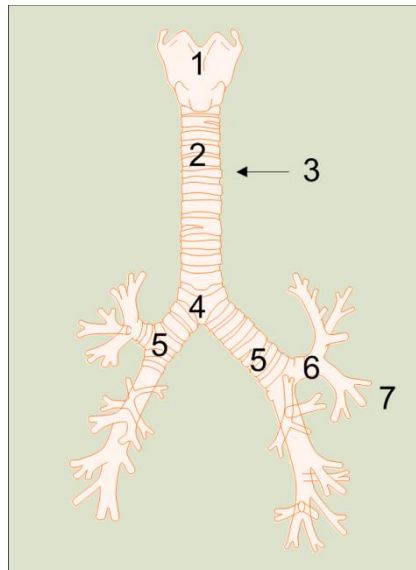


Abbildung 2: Anatomische Darstellung (1) Kehlkopf (Larynx) (2) Luftröhre (Trachea) (3) Knorpelspannen (Cartilagine tracheales) (4) Teilungsstelle der Luftröhre (Bifurcatio trachea) (5) Hauptbronchus (Bronchus principales) (6) Lappenbronchien (Bronchus lobaris) (7) Segmentbronchien (Bronchus segmentalis)

Die Trachea zeigt einen dreischichtigen Wandaufbau. Die Tunica adventitia ist eine Schicht aus lockerem Bindegewebe zur Befestigung der Luftröhre im Körper. Die Tunica fibromusculocartilaginea besteht aus den hufeisenförmigen Knorpeln sowie glatter Muskulatur und die Tunica mucosa besteht aus einem mehrreigen Flimmerepithel und der bindegewebigen Lamina propria (Abbildung 3).



Abbildung 3: Querschnitt der Trachea (1) mehrreihiges hochprismatisches Flimmerepithel (Lamina epithelialis mucosae) (2) lockeres Bindegewebe (Lamina propria mucosae) (3) Knorpelspanne (hyaliner Knorpel) (4) lockeres Bindegewebe (Tunica adventitia)

Die im respiratorischen Epithel vorhandenen Flimmerzellen sorgen mit ihren koordinierten Zilienbewegungen für den Abtransport der schleimhaftenden Fremdkörper. Dieser Vorgang wird mukoziliäre Clearance genannt. Die Fremdkörper werden Richtung Pharynx transportiert und entweder verschluckt oder abgehustet. Die Luftröhre kann durch Infektionen, Tumore oder traumatische Ereignisse, wie beispielsweise Unfälle oder Intubation, verletzt werden, was zu starken Ventilationsproblemen der Lunge führt. Auch angeborene Fehlbildungen wie Agenesie, Atresie oder langstreckige Stenosen können einen Luftröhrenersatz notwendig machen [12]. Diese Gruppe von Patienten kann im Moment nur palliativ mit Stents oder T-Tube behandelt werden [13]. Die durch die Wundheilung und chirurgische Maßnahmen entstehende Narbenbildung kann, genauso wie beispielsweise die Vergrößerungen der Schilddrüse oder Tumore, zur Verengung (Stenosierung) der Atemwege führen [14]. Dies beeinträchtigt nicht nur die Lebensqualität, sondern kann lebensbedrohliche Zustände hervorrufen [13]. Kleine stenotische Verengungen von bis zu 4 cm Länge können durch End-zu-End-Anastomosen erfolgreich therapiert werden [13-16]. Dies gelang schon 1881 [17] an einem Tiermodell. 1909 wurde von Nowakowski [18] und 1912 von Levit [19] Haut und die Faszie des Oberschenkels zur Therapie von Luftröhrendefekten eingesetzt. Erst im Zeitraum 1951 - 1953 [20-22] kam man wieder auf die End-zu-End Anastomose zurück. Dabei konnten allerdings maximal 2-3 Trachealringe entfernt werden. Erst Michelson [23] konnte in einem Tiermodell die Trachea aus dem umliegenden Gewebe lösen und die Resektion auf 12 Ringe (circa 4-6 cm) erhöhen. Diese Technik wurde 1964 [24] an humanen Leichen getestet. Durch die Haltung des Halses kam es dabei, bei zunehmender Länge der Resektion, zum exponentiellen Anstieg der Spannung. Die Resektionslänge konnte durch eine veränderte Technik, welche zur Beugung im Halsbereich führte, auf Defekte bis 6 cm Länge erweitert werden. Bei Defekten von über 6 cm stößt diese Operationstechnik an ihre Grenzen. Deshalb sind Trachealprothesen aus unterschiedlichsten Materialien im Einsatz [13]. Es ließ sich jedoch bis heute keine ideale Prothese für größere Resektionen entwickeln. Ein idealer Ersatz für die Trachea sollte laterale Stabilität und longitudinale Elastizität kombinieren und die Aufgaben des respiratorischen Epithels übernehmen [13, 25]. Das verwendete Material sollte reizlos in das Gewebe einwachsen und somit keine Infektionen, Granulationen oder Erosionen hervorrufen.

Zusätzlich sollte es biokompatibel, nicht immunogen, thrombogen, toxisch oder kanzerogen sein [26, 27]. Durch eine ausreichende Besiedlung mit autologen Zellen kann das Risiko einer Infektion sowie die Entstehung von Granulationsgewebe reduziert [28] werden. Die eingesetzten Zellen müssen dazu ausreichend versorgt werden. Hierfür ist eine effiziente Vaskularisierung des Implantats zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen über den Blutkreislauf notwendig. Dies erhält die Vitalität und beugt Nekrosen vor [29, 30]. Die Heilungsphase ist aufgrund der anatomischen Besonderheit der Trachea kritisch. Postoperative Infektionen und die dadurch entstehenden Schwellungen belasten die Nähte, welche sich hierdurch im ungünstigsten Fall auch wieder öffnen können [31]. Die Luftröhre hat keinen eigenen Zugang zum Blutgefäßsystem sondern wird über kleinlumige Verzweigungen des Netzwerks der Schilddrüsengefäße oder der Bronchialarterien versorgt [11, 32]. Bei chirurgischen Eingriffen kann es zur Zerstörung dieses Bereiches und damit zu Problemen bei der Wundheilung kommen. Diese wird zusätzlich durch den ständigen Kontakt mit der Atemluft und den im Mundraum befindlichen Keime erschwert. Falls es durch Nekrosen im Bereich der Anastomosen zur erneuten Öffnung der Defekte kommt, kann die Atemluft ungefiltert in den Brustkorb einströmen und diesen infizieren. Wenn kurative Maßnahmen zur Behandlung einer infizierten Resthöhle nicht möglich sind, eine Behandlung zum Überleben des Patienten aber notwendig, muss ein Thorakostoma angelegt werden. Dieses Fenster in der Brustwand dient dann zur offenen Behandlung der Infektion und wird in Abbildung 4 gezeigt.

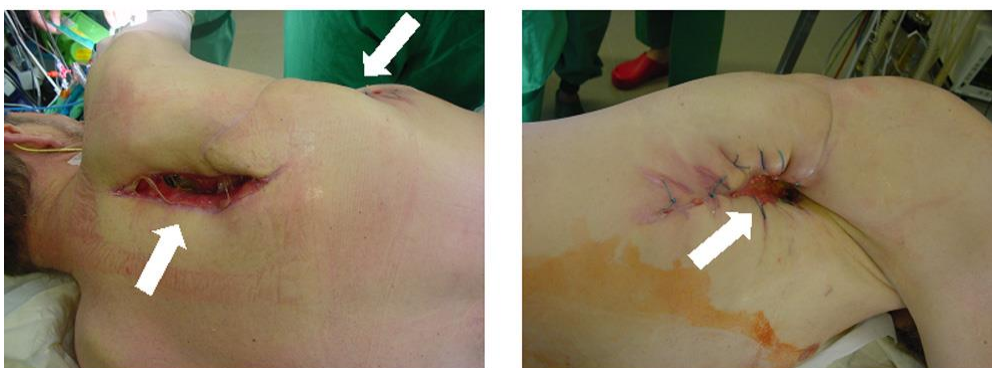


Abbildung 4: Thorakostoma bei infizierter Resthöhle

Die Lebensqualität der Patienten wird hierdurch massiv beeinträchtigt und durch die Bildung von Borken und den durch Infektionen verursachten extremen Mundgeruch weiter herabgesetzt [13].

1.3 Rekonstruktion der Trachea

Die Behandlungserfolge der verschiedenen Operationstechniken und die Verwendung von Prothesen bei großen Defekten der Luftröhre sind meist nur kurzfristig [12]. Tubuläre Prothesen verschiedenster Materialien sind in Tierexperimenten und in Ausnahmefällen auch in der Klinik zum Einsatz gekommen. In Hundemodellen wurden in der Vergangenheit Stahlrohre [33, 34], Stahlspiralen [35], Glasröhren [33]), Polyethylenstrukturen [36], Silikonschläuche [37, 38] und Teflonröhren [39, 40] getestet. Diese Prothesen sind aufgrund ihrer Unflexibilität im Körper gewandert und haben sich vom Ort der Implantation entfernt. Eine Epithelialisierung war selten zu beobachten. Dafür kam es zu Infektionen an den Wundrändern, zur Granulation und zur Bildung von Stenosen. Poröse Prothesen aus Polytetrafluoroethylen (PTFE) [41], Polyurethan [42] oder von Plastikringen bzw. Spiralen gestützte Netzen [43-45] fanden ebenso in Tierversuchen Verwendung. Sie wurden hier zur Abdichtung mit Omentum aus der Bauchhöhle, mit Faszien oder mit Perikard umwickelt. Der klinische Einsatz war hierbei sehr eingeschränkt. Diese durchlässigen Grafts wiesen jedoch eine bessere Zellmigration, allerdings auch eine höhere bakterielle Besiedlung auf. Außerdem bildeten sich Narbengewebe und Stenosen [46]. Xenogene, autogene und allogene Kadavertracheen, fixiert durch Stickstoff, Alkohol, Formalin oder Glutaraldehyd, kamen in Großtiermodellen zum Einsatz [27] und zeigten keinen Erfolg. Bioprothesen aus Omentum [47], Rippenmuskel [48] oder Rippe und Pleura [49], welche direkt oder indirekt vaskularisiert waren, wurden ebenfalls als Ersatz für die Luftröhre verwendet. Die Vaskularisierung förderte dabei den Heilungsprozess. Im Bereich des Tissue Engineering kam es 1994 zu ersten Ergebnissen mit trachealem Ersatz. Hierbei wurde eine *Marlex Mesh Tube* mit einer Spirale versehen, mit Kollagen beschichtet und zum Ersatz von 2 – 4 cm chirurgisch entfernter Trachea in Hunden benutzt [50]. Zur ersten humanen Anwendung kam es 2002, wobei eine *Marlex Mesh Tube* mit Kollagen beschichtet und implantiert wurde. Nach zwei Monaten konnte eine vollständige Epithelialisierung beobachtet werden. 2004 kam es zur ersten humanen, autologen Implantation von künstlich hergestelltem Tracheagewebe.

Hierzu ist ein azellularisiertes Stück Schweinejejunum mit autologen Muskelzellen und Fibroblasten besiedelt und nach 3-wöchiger Kultur erfolgreich in einem Patienten mit trachealer Fistel eingesetzt worden [51] (Abbildung 5).

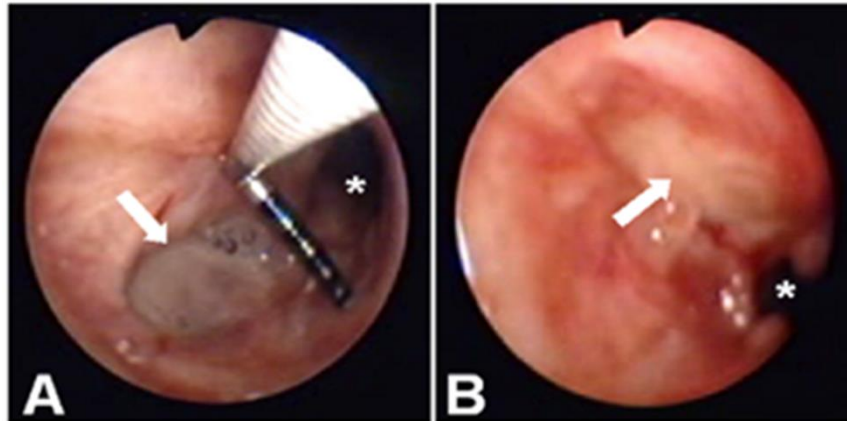


Abbildung 5: Bronchoskopie des 2004 mit einem autolog besiedelten Patch behandelten Patienten; Defekt in der Trachea (A), eingehheilter Patch (B)

Weiterhin kam es im selben Jahr zur Verwendung allogenen Aortengewebes in Kombination mit Trachea Stents [52]. Bei zwei auf diesem Weg therapierten Patienten konnte ein Jahr nach der Implantation die Bildung von Epithel im ehemaligen Aortenlumen beobachtet werden. 2008 wurde eine azellularisierte humane Trachea mit aus mesenchymalen Stammzellen differenzierten, Chondrocyten und epithelialen Zellen besiedelt, in einem Bioreaktor kultiviert und schließlich transplantiert. Diese Behandlung resultierte in einer guten Heilung, verbunden mit einem starken Anstieg der Lebensqualität [53]. 2010 bekamen Prof. Thorsten Walles und sein Team den von-Langenbeck Preis für sein Operationsverfahren zur Behandlung schwerer Luftröhrenverletzungen mit künstlich hergestelltem Gewebe basierend auf azellularisiertem porcinen Jejunum, welches autolog mit mikrovaskulären Endothelzellen und Skelettmuskelzellen besiedelt worden war. 2011 kam eine speziell auf die Maße des Patienten gefertigte Prothese zum Einsatz. Dieses Konstrukt wurde für 36 Stunden in einem Bioreaktor mit mononukleären Zellen besiedelt und danach implantiert. Im Anschluss wurde der Patient mit Filgastrim und EPO behandelt. Nach 5 Monaten ließen sich ein gutes Einheilen und Tumorfreiheit diagnostizieren [54]. 2012 berichtete Elliott [55] über eine erfolgreich Operation eines Kindes. Dieses war mit einer schweren Trachealstenose und einer Schlingenbildung der Pulmonalarterie geboren worden. Nach vielfältigen Operationen und Therapien kam es im Alter von 10 Jahren zum Einsatz einer

azellularisierten, humanen Spendertrachea welche mit mesenchymalen Stammzellen und Gewebestücken aus dem respiratorischen Epithel des Patienten besiedelt sowie durch den Einsatz von Stunts gestützt wurde. Zusätzlich erfolgte die Simulation der Zellen durch hr-EPO, G-CSF und TGF- β . Nach zwei Jahren konnte eine erfolgreiche Bildung von respiratorischem Epithel nachgewiesen werden. Das Kind ist seit dem Einsatz der Prothese 11 cm gewachsen, ohne dass es zu Komplikationen mit dem Transplantat kam [55].

Kontrollierte klinische Studien müssen nun zeigen, welche dieser teils vielversprechenden Ansätze das größte Potential haben und wo die jeweiligen Limitationen liegen.

1.4 Matrices in der Regenerativen Medizin

Matrices dienen in der Regenerativen Medizin als Trägergerüst für die Kultur von Zellen und sorgen für eine dreidimensionale Struktur. Sie müssen die Adhäsion und Ernährung der Zellen ermöglichen, biokompatibel sein und sich möglichst reizlos in das Gewebe einfügen. Prinzipiell kann jedes synthetische oder biologische Material als Matrix für das Tissue Engineering verwendet werden, vorausgesetzt es ist bioverträglich [31] und lässt sich je nach Anwendungsgebiet von den Zellen gewebespezifisch ab- und umbauen [56]. Diese Voraussetzungen erfüllen zahlreiche sowohl synthetische als auch natürliche Materialien, wobei beide ihre Vor- und Nachteile haben. Synthetische Materialien wie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polymilchsäuren (PLA), Hydrogele, Poly-3-hydroxybutyrat (P-3-HB), Polyglycolidsäure (PGA), Poly-4-hydroxybutyrat (P-4-HB) und Polyhydroxyoctanoat (PHO) [56-58] besitzen eine unterschiedliche Porengröße, sind nach Belieben formbar und stabil. Physikalische, chemische oder biologische Modifikationen können die Eigenschaften der Matrix, wie beispielsweise den Abbau, die Oberflächeninteraktionen oder die Mikroumgebung direkt beeinflussen und somit die Signaltransduktion verändern [59]. Synthetische Materialien inkorporieren oft schlecht und ein Umbau in körpereigenes Gewebe findet selten statt [60].

Als natürliche Matrices finden beispielsweise Alginat [61], Kollagene [62] oder auch azellularisierte Gewebe [63] ihren Einsatz. Bei letzteren ist es zunächst notwendig die nativen Zellen mit chemischen oder mechanischen Mitteln zu entfernen. Es ließen sich bereits verschiedenste Gewebe und Organe wie beispielsweise der

Dünndarm [1], die Blase [64, 65], die Haut [66], die Lunge [67], die Herzklappen [68], die Gefäßklappen [69] oder die Niere [70] azellularisieren. Je nach Verfahren bleibt die natürliche Mikroumgebung aus beispielsweise Kollagenen, Elastin, Fibronectin sowie anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix erhalten und der Nachweis von Wachstumsfaktoren ist möglich [71-73]. Nach einer Implantation können solche azellularisierten Matrices mit dem Körper interagieren und Angiogenese induzieren [60]. Die indirekte Vaskularisierung der meisten Matrices kann die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen limitieren [74]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich sowohl mit der Weiterentwicklung als auch der Optimierung der Herstellung und Qualitätsprüfungsverfahren für den späteren Einsatz als Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP) der sogenannten biologisch vaskularisierten Matrix (**Biological Vascularized Scaffold**) kurz BioVaSc [75-81]. Diese BioVaSc ist ein azellularisiertes, vaskularisiertes Stück porcinen Dünndarms mit der zugehöriger Arterie und abführender Vene. Während der Azellularisierung bleibt das Gerüst des Gefäßsystems erhalten, wodurch die BioVaSc anastomisierbar ist und die Versorgung größerer Areale sichergestellt werden könnte (Abbildung 6).

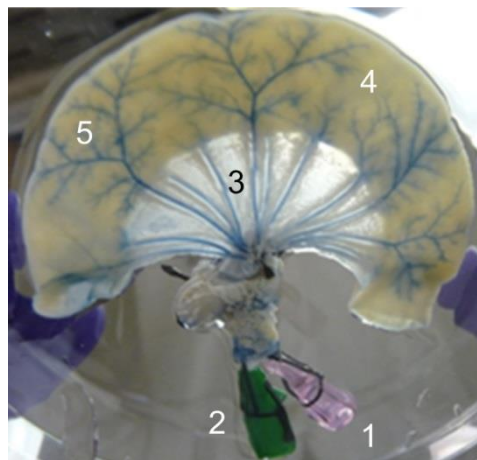


Abbildung 6: Biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc). Das arterielle Gefäßsystem ist mit Trypanblau dargestellt. (1) arterieller Zufluss (2) venöser Abfluss (3) Gefäßpaar (4) Darmwand (5) Gefäßast

Der Aufbau ähnelt der SIS (small intestinal submucosa), welche sich schon als komplett biokompatibles, resorbierbares Grundgerüst bewährt hat [60] und die Adhärenz, zelluläre Migration und Stimulierung von Zellen ermöglicht [82, 83]. Zusätzlich bleiben bei der BioVaSc die Matrixstrukturen der Mucosa, Serosa und des versorgenden Mesenteriums sowie die Gefäßstrukturen erhalten (Abbildung 7).

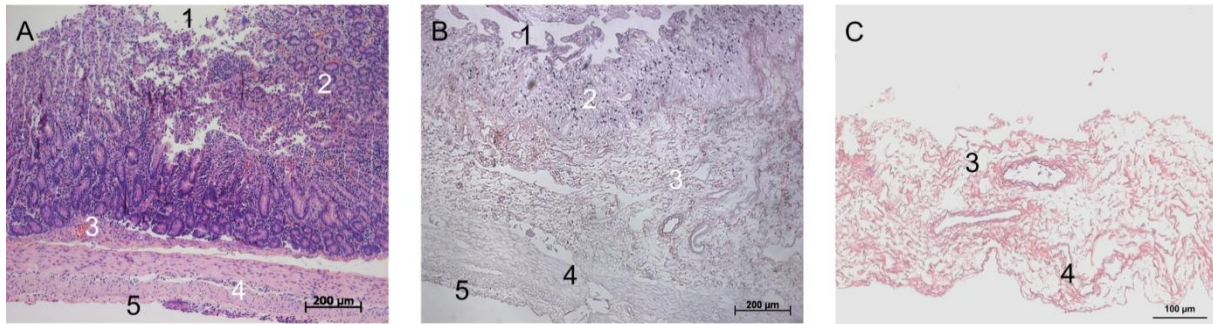


Abbildung 7: H&E-Färbung (A) nativer Darm (B) azellularisierte BioVaSc (C) SIS. 1: Darmlumen 2: Tunica mucosa 3: Tela submucosa 4: Tunica muscularis aus Stratum circulare (innen) und Stratum lonigitudinale 5: Tunica serosa

1.5 Zellquellen in der Regenerativen Medizin

In der Regenerativen Medizin verwendete Zellen können autolog, allogon oder xenogen sein [84]. Autologe Zellen können direkt aus Biopsien des Patienten isoliert und *in vitro* expandiert werden [3, 85]. Der entscheidende Vorteil dieser Zellen ist, dass sie einen Verzicht auf Immunsuppressiva ermöglichen. Allerdings ist die Gewinnung nicht für alle zu regenerierenden Gewebe möglich, weil es beispielsweise nicht möglich ist, entsprechende Biopsien aus dem jeweiligen Organ zu entnehmen [84]. Die Verwendung von allogenen bzw. xenogenen Quellen ist durch die erhöhte immunologische Reaktion limitiert. Xenogene Zellen werden heute ausschließlich in extrakorporalen Organsatzsystemen zur Überbrückung von maximal sechs Tagen z.B. bei Leberversagen verwendet. Eine Implantation wird aufgrund der zu erwartenden starken Abstoßungsreaktionen nicht durchgeführt [86]. Eine weitere Zellquelle stellen embryonale oder adulte Stammzellen dar. Diese können in verschiedene Zelltypen differenzieren und besitzen ein hohes Proliferationspotenzial [87]. Embryonale Stammzellen können aus der Blastozyste von Embryonen isoliert werden und finden sowohl aus ethischen Gründen, ihrer geringen Verfügbarkeit und der zu erwartenden Immunreaktion des Empfängers bisher selten in der Klinik Verwendung [88]. Adulte Stammzellen können aus somatischen Zellen des Patienten wie beispielsweise aus dem Knochenmark [89], zentralen Nervensystem [90], Muskel [91], Haarfollikeln [92] oder Fettgewebe [93] isoliert werden. Dabei ist das Problem der gezielten Induktion von Stammzellen in einzelne Differenzierungsrichtung nur stellenweise gelöst. Hierfür kommen beispielsweise Wachstumsfaktoren in Zellkulturmedien oder aus Ko-Kulturen [94, 95] und dynamische Kultivierungsbedingungen in Bioreaktoren [96-98] in Frage. Zusätzlich wird auch der Einfluss der extrazellulärer Matrices [99] hinsichtlich der Differenzierung der Zellen

untersucht. Ziel ist die reproduzierbare Steuerung der Differenzierungsvorgänge in der Zellkultur und auch die Vermeidung von Entartung. Eine weitere Zellquelle sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen). Diese werden durch eine Reprogrammierung somatischer Zellen hergestellt [100-102]. Dabei wird die Expression von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zellen *in vitro* angestoßen und so Pluripotenz erzeugt. Sie haben in der Klinik ein hohes Potential, da die ethischen Probleme im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht gegeben sind und eine autologe Verwendung möglich ist.

1.6 Reaktorsysteme für die Implantatherstellung

Die klassische Zellkultur ist zweidimensional und greift vor allem auf Flaschen oder Petrischalen aus oberflächenbehandeltem Polystyrol zurück. Primäre Zellen dedifferenzieren unter diesen artifiziiellen Bedingungen und verändern ihren Stoffwechsel sowie die Morphologie [103]. Spezielle Medien für primäre Zellen sollen diesen Prozess durch die Zugabe spezieller Zusätze verzögern, können ihn allerdings nicht verhindern [103]. Damit primäre Zellen ihre Funktionalität behalten, ist es nötig, ihnen eine *in vivo* ähnliche Mikroumgebung zu bieten. Dazu gehören neben Matrix, Zell-Zell-Kontakten auch mechanische Stimuli. Die Bioreaktortechnologie ermöglicht neben der statischen Kultivierung auch die dynamische Kultur (Abbildung 8).

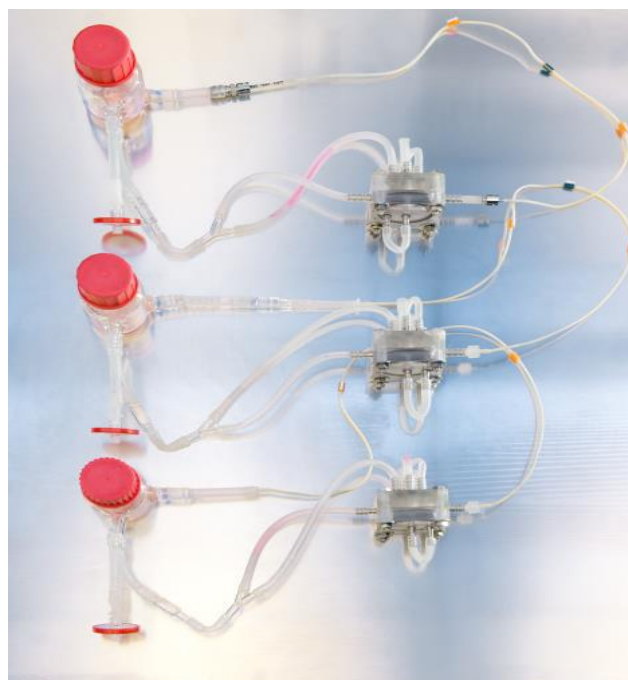


Abbildung 8: Bioreaktoren zur dynamischen Kultur von Zellen auf verschiedenen Matrices

Durch Bioreaktoren können die Zellen *in vitro* einem möglichst körpernahen positiven Stimuli, welche der Dedifferenzierung der Zellen entgegenwirkt, ausgesetzt werden [97]. Je nach Zelltyp können das unterschiedliche mechanische Bedingungen wie Dehnung, Zug, Druck oder Scherbewegungen sein [96, 97]. Bei der Herstellung von Knorpel konnte durch den Einsatz rotierender Bioreaktoren beispielsweise die Elastizität erhöht werden [104]. Andere Arbeiten belegen, dass mesenchymale Progenitorzellen unter Zug- und Dehnungsstress differenzieren [98]. Scherstress durch pulsatile Perfusion mit Nährmedium hat positiven Einfluss auf die Zellen des Blutgefäßsystems [105, 106]. Zusätzlich zum Scherstress ermöglicht die Perfusion auch eine bessere Versorgung der Zellen, da Nährstoffe, Gase und Endprodukte des Stoffwechsels verstärkt transportiert werden und es nicht wie bei statischen Kulturen zur Gradientenbildung kommt. Durch den mechanischen Reiz kann es zu einer verbesserten Differenzierung von Stammzellen kommen [107]. Allerdings muss die Belastung genau dosiert sein, da es ansonsten zu unerwünschten Veränderungen kommen kann [108]. Gewebe für den Luftröhrenersatz sind im Moment meist dünner und weicher als das Original [109]. Die Entwicklung der Reaktoren geht deshalb hin zu einer immer besseren Simulierung der *in vivo* wirkenden Kräften, um eine verbesserte *in vitro* Reifung der Implantate zu erzielen. Die Durchströmung von vaskularisierten Gewebekonstrukten wird inzwischen über Computer gesteuert, um eine möglichst realistische Simulation des Blutflusses zu erreichen [97]. Somit können schrittweise die *in vivo* herrschenden Bedingungen immer besser nachgebildet werden.

1.7 Anforderungen an die Produktion von Arzneimitteln für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products = ATMP) nach der guten Herstellungspraxis

Die Weiterentwicklung des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin in der Herstellung von Implantaten haben die Erweiterung des Arzneimittelbegriffs und den damit verbundenen Regularien notwendig gemacht. Zellen oder Gene, die zur Heilung verschiedenster Krankheiten eingesetzt werden, unterscheiden sich stark von den bisher verwendeten Arzneimitteln und werden deshalb in einer neuen Produktgruppe zusammengefasst: den Arzneimitteln für neuartige Therapien oder auch Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP). Die Besonderheiten dieser Produkte bedurften einer neuen Gesetzgebung und so wurde 2007 eine eigene EU-

Verordnung (EG Nr. 1394/2007) erlassen. Unter Arzneimittel für neuartige Therapien werden die drei Arzneimittelklassen der somatischen Zelltherapeutika, der Gentherapeutika und der biotechnologisch bearbeiteten Gewebezubereitungen zusammengefasst. Je nachdem welcher Produktklasse ein ATMP zugeteilt wird, gelten unterschiedliche gesetzliche und regulatorische Anforderungen. Die Einteilung erfolgt nach folgenden Punkten:

1. Somatische Zelltherapeutika

- haben in der Regel im Empfänger eine andere Funktion als im Spender
- dienen der Behandlung, Diagnose oder der Vorbeugung von Erkrankungen. Dabei werden metabolische, immunologische und pharmakologische Eigenschaften der Zellen genutzt.
- wurden grundlegend verändert, so dass sich biologische, physiologische oder strukturelle Funktionen bzw. Eigenschaften verändert haben

2. Gentherapeutika

- erzielen ihre therapeutische Wirkung durch eine rekombinante Nukleinsäure als aktive Substanz
- zielen auf eine Veränderung einer genetischen Sequenz in der Zielzelle durch Addierung, Regulation, Reparation, Ersetzung oder Entfernung der jeweiligen Sequenz

Hierbei gibt es die Ausnahme von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten. Diese können beide Eigenschaften erfüllen und werden trotzdem nicht als Gentherapeutikum klassifiziert.

3. Biotechnologisch bearbeitete Gewebezubereitungen für die Regenerative Medizin

- enthalten Zellen, um Gewebe zu reparieren, zu ersetzen oder zu regenerieren. Diese erfüllen im Empfänger nicht den gleichen Zweck wie im Spender.
- beinhalten sowohl die Verwendung von lebendem als auch totem Gewebe und Zellen. Dies kann tierischen oder humanen Ursprungs sein und weitere Substanzen beinhalten.

Die laufende Entwicklung von ATMP's findet oft an Universitäten und den zugehörigen Kliniken für schwere und/oder seltene Erkrankungen statt. Eine Zulassung muss zentralisiert über die Europäische Arzneimittelagentur (EMA= European Medicines Agency) erfolgen. In Deutschland ist für die Erteilung einer Herstellerlaubnis eine Landesbehörde (Arzneimittelüberwachung) zuständig. Das Paul-Ehrlich-Institut als zuständige Bundesbehörde wird beratend hinzugezogen und ist zuständig für die Genehmigung der anschließenden klinischen Studien. Voraussetzung für eine Herstellerlaubnis und die klinischen Studien sind ein etablierter, valider GMP Prozess sowie valide präklinische Daten. Einen Überblick über die gesetzliche Lage gibt Abbildung 9.

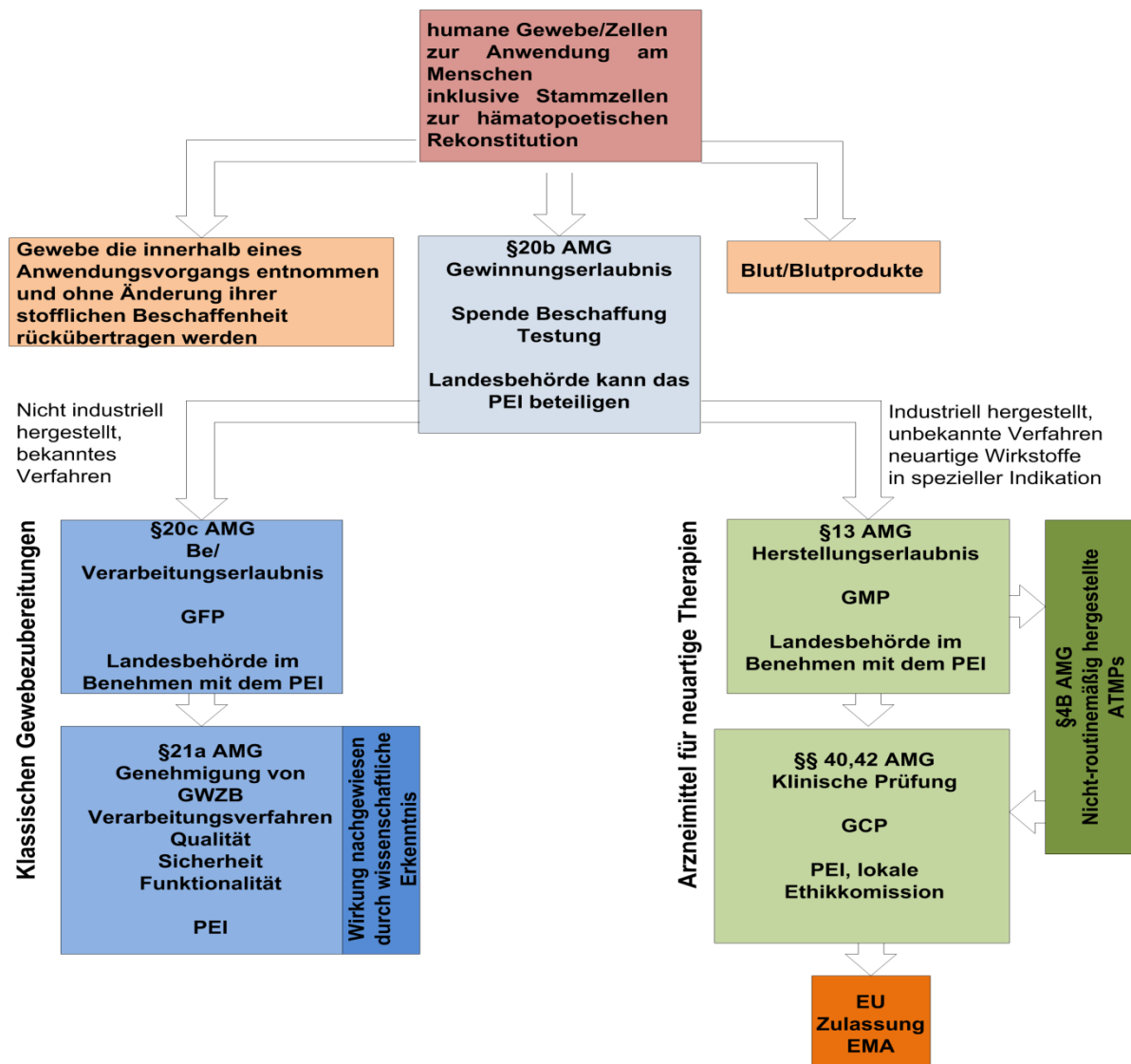


Abbildung 9: Überblick über die gesetzliche Lage der ATMP's in Deutschland.

(Quelle: Vortrag Dr. Ralf Sanzenbacher, Zellkultur unter GMP, Promocell Academy)

Nachdem für humane Zellen oder Gewebe, welche zur Anwendung am Menschen kommen und nicht ohne Änderung rückübertragen werden, bzw. für Blutprodukte die Gewinnungserlaubnis nach §20b erteilt wurde, kommt es zur Unterscheidung zwischen klassischen Gewebezubereitungen und den ATMPs. Klassische Gewebezubereitungen sind nach einem bekannten Verfahren nicht industriell hergestellt worden und ihre Wirkung ist durch wissenschaftliche Erkenntnisse nachgewiesen. Hierzu zählen beispielsweise Herzklappen oder die Hornhaut des Auges. ATMPs werden nach unbekanntem, nicht etabliertem Verfahren industriell hergestellt und enthalten neuartige Wirkstoffe für spezielle Indikationen. Für diese muss eine Herstellungserlaubnis erteilt werden. Nach anschließender erfolgreicher klinischer Prüfung ist es notwendig, die Zulassung über die EMA zu beantragen. Hierfür ist das "Committee for Medicinal Products for Human Use" (CHMP) zuständig. Da es bei ATMPs zusätzliche Expertise benötigt, ist das Komitee für neuartige Therapien (Committee for Advanced Therapies: CAT) gegründet worden. Dieses besteht, genauso wie das CHMP, aus Experten, welche die Mitgliedstaaten repräsentieren. Die Mitglieder des CAT weisen Fachwissen im Bereich der ATMPs auf und werden von Patienten- und Ärztevereinigungen unterstützt. Diese haben gleichwertige Funktionen und Stimmrecht wie die Mitgliedstaaten. Damit der Austausch gesichert ist, sind fünf Mitglieder des CAT gleichzeitig Vertreter im CHMP.

Eine Ausnahme dieser zentralen Zulassung ist über den Paragraph 4b des AMG möglich. Er kann für ein Arzneimittel beantragt werden, wenn dieses ein ATMP ist, individuell verschrieben und für einen einzelnen Patienten angefertigt, also nicht routinemäßig hergestellt und unter fachlicher Anwendung eines Arztes in demselben Mitgliedstaat verwendet wird, in dem es auch hergestellt wurde. Hierbei wird von nicht-routinemäßiger Herstellung gesprochen, wenn: nur im geringen Umfang produziert, aufgrund eines einzelnen Patienten vom Standardverfahren abgewichen wird oder die Anzahl des produzierten Arzneimittels noch nicht ausreichend ist, um eine umfassende Beurteilung vorzulegen. Eine Herstellung und Anwendung nach §4b des Arzneimittelgesetzes muss beim Paul-Ehrlich Institut beantragt werden.

ATMPs müssen unter den Bedingungen der „Guten Herstellungspraxis“ (Good manufacturing practise = GMP) hergestellt werden. Darunter sind Richtlinien zur

Qualitätssicherung von Produktionsabläufen und deren Umgebung zur Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen, genauso wie von Kosmetika, Lebens- und Futtermitteln, zusammengefasst. Das Ziel ist es, den Verbraucher oder Patienten vor bedenklichen oder gefährlichen Produkten zu schützen. Laut Arzneimittelgesetz dürfen nur unbedenkliche, wirksame und qualitativ einwandfreie Arzneimittel für Tiere und Menschen in den Verkehr gebracht werden. Schwerpunkte der Guten Herstellungspraxis sind Regularien zu den benötigten Räumen, die Hygiene, den verwendeten Geräten, die GMP gerechte Dokumentation und Qualitätskontrolle. Ziel ist es, Kreuz- bzw. mikrobiologische Kontaminationen oder Verwechslungen auszuschließen. Da Abweichungen in der Qualität direkten Einfluss auf die Gesundheit des Patienten nehmen, spielt die Qualitätssicherung eine große Rolle. Qualitätsmanagementsysteme sorgen für die gleichbleibende Qualität und für die durch die Gesundheitsbehörden überprüfbare Einhaltung der Anforderungen des GMP's und des Arzneimittelgesetzes. Vom Gesetzgeber sind mehrere Personalstellen in Schlüsselpositionen vorgesehen, welche dieses System funktionell aufrechterhalten sollen (Abbildung 10).



Abbildung 10: Die Verantwortlichkeiten im GMP

Für die Herstellung ist ein Leiter vorgesehen, welcher für alle Belange der Herstellung zuständig ist. Unabhängig und gleichgestellt hierzu ist die Position des Leiters der Qualitätskontrolle zu besetzen. Für beide Positionen werden von den jeweiligen Personen bestimmte Voraussetzungen an Ausbildung und Erfahrung im jeweiligen Fachbereich gefordert. Diesen Positionen vorangestellt wird die sogenannte Sachkundige Person oder auch Qualified Person. Sie ist für die Einhaltung aller Herstellungs- und Prüfkriterien sowie die Freigabe einer Produktionscharge verantwortlich. Die Voraussetzungen für diese Position entsprechen denen der vorgenannten Stellen. Eine weitere wichtige Funktion erfüllt der sogenannte Qualitätssicherungsbeauftragte. Diese Person überprüft und überwacht die Dokumentation des Qualitätssicherungssystems. Die dazugehörigen Richtlinien befinden sich im Arzneimittelgesetz, dem GMP-Leitfaden und der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung. Dieses Gesamtsystem sorgt für einen gleichbleibend hohen Standard bei der Herstellung und Qualitätsprüfung von Arzneimitteln und betrifft die Bereiche der Hygiene, der Reinräume, der Ausrüstung,

der Personals, der Dokumentation und der Inspektion. Alle diese Bereiche müssen bei der Herstellung eines ATMPs berücksichtigt werden und sichern so die Qualität die vom Gesetzgeber gefordert wird. Die Produktion in Reinräumen ist zentraler Bestandteil der GMP-Regularien. In diesen Räumen wird die Konzentration der sich in der Luft befindlichen Partikel so gering wie möglich gehalten, wobei die genau zulässige Konzentration von der geforderten Reinraumklasse abhängt. Sie sollen die keimfreie Produktion und damit die Sicherheit des Patienten gewährleisten. Hierzu dient auch die GMP gerechte Dokumentation aller durchgeführten Arbeiten sowie der entstandenen Ergebnisse. Die Freigabe des Arzneimittels kann erst bei erfolgtem Nachweis aller vorgeschriebenen Regularien und spezifikationsgerechten Ergebnisse erteilt werden.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein Arzneimittel für neuartige Therapien oder auch Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) zur Behandlung schwerwiegender Luftröhrenverletzungen, basierend auf autologen Zellen und einer azellularisierten Matrix, zu entwickeln. Dabei handelt es sich um ein *orphan medicinal product*, also ein Arzneimittel für seltene Leiden. In Europa bedeutet dies, dass weniger als 5 von 10.000 Einwohnern davon betroffen sind. Diese Arzneimittel haben dadurch bedingt einen limitierten Markt und sind wegen des geringen zu erwartenden Umsatzes, bei gleichzeitig sehr hohen Entwicklungskosten, für die Pharmaindustrie eher weniger interessant. Die zuständigen europäischen Behörden unterstützen die Entwicklung von diesen Arzneimitteln durch eine vereinfachtes, günstigeres Zulassungsverfahren und durch die Gewährung eines alleinigen Vertriebsrechts über 10 Jahre.

Im Verlaufe dieser Arbeit sind sowohl die Methoden zur Azellularisierung der Matrix, der Isolation und Kultivierung der Zellen, der Inkubatorwagen und Bioreaktor sowie die Rebesiedlung und Kultur des autologen Transplantats als auch die der Qualitätskontrolle unter den Regeln der "Guten Herstellungspraxis" (Good Manufacturing Practise = GMP) zu etablieren (Abbildung 11).

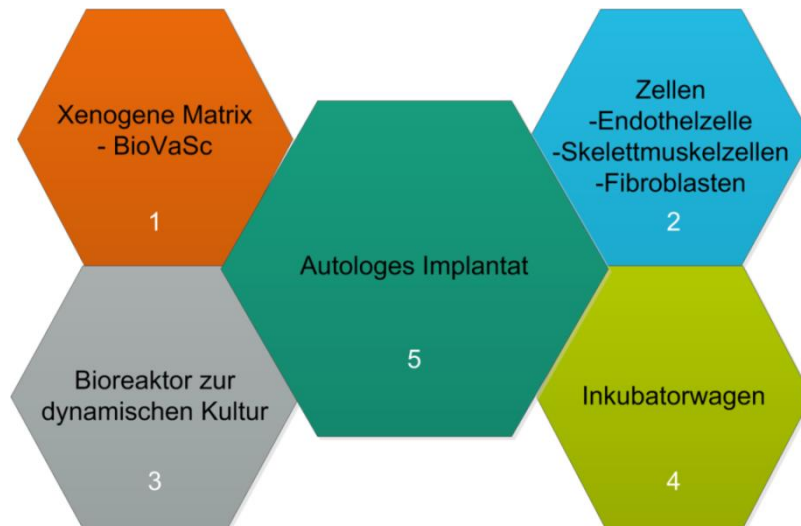


Abbildung 11: Überblick über die Projektteile der Herstellung und Qualitätskontrolle. (1) Azellularisierung der Matrix (2) Isolation der Zellen (3) Bioreaktoren (4) Inkubatorwagen (5) autologes Implantat

Für die Herstellung des autologen Implantats wird als xenogenes Trägermaterial für die Zellen die sogenannte biologisch, vaskularisierte Matrix (BioVaSc), ein Stück azellularisierter Dünndarm aus dem Schwein, der eine zuführende Arterie und die abführende Vene beinhaltet, verwendet. Parallel dazu werden die Isolationsprotokolle für die Skelettmuskelzellen, die Fibroblasten und die mikrovaskulären Endothelzellen etabliert. Im Anschluss ist die Rebesiedlung mit den autologen mikrovaskulären Endothelzellen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten der BioVaSc zu optimieren und das Kultivierungsverfahren im dafür angefertigten Bioreaktorsystem unter GMP-Bedingungen zu etablieren (Abbildung 12).

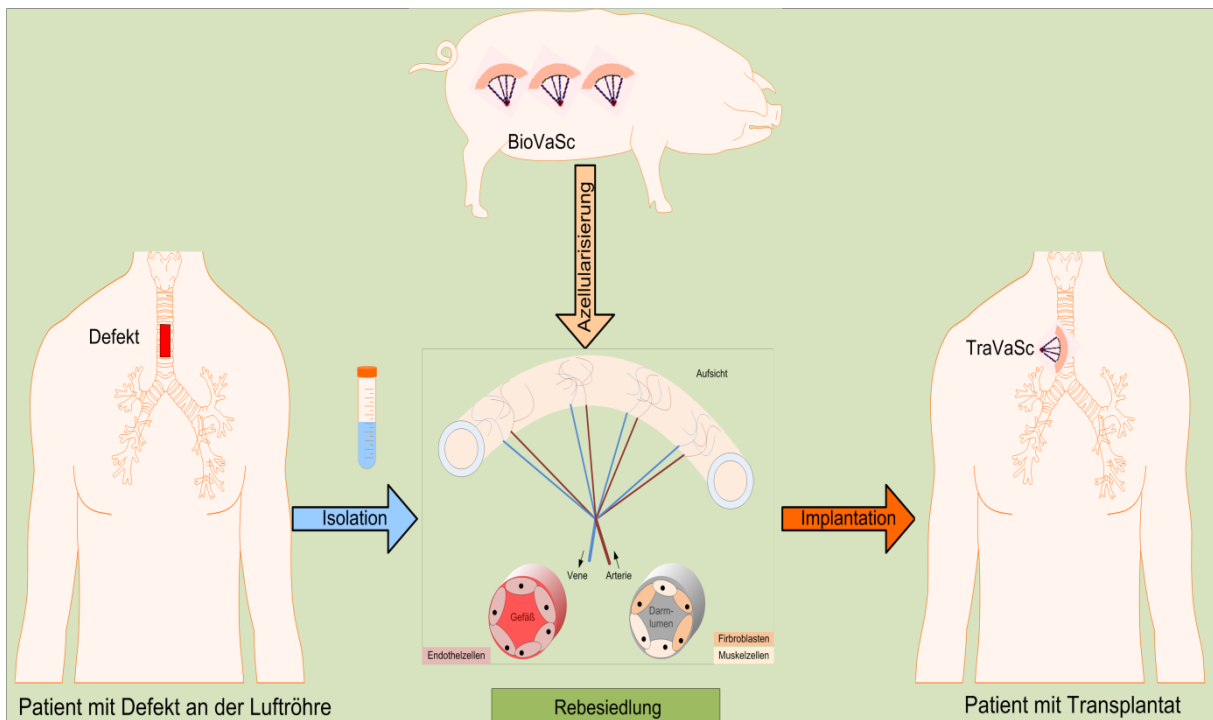


Abbildung 12: Dem Patienten werden Muskel- und Hautbiopsien entnommen und im Labor mikrovaskuläre Endothelzellen, Skelettmuskelzellen sowie Fibroblasten isoliert. Parallel dazu wird die Matrix (BioVaSc) aus dem Schwein entnommen und azellularisiert. Danach erfolgt die Rebesiedlung mit den kultivierten Zellen. Nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktorsystem erfolgt die Implantation des autolog besiedelten Implantats.

Die Verwendung der Matrix als Bestandteil des ATMP bedingt die Entwicklung und Adaptierung der Protokolle zur Herstellung des autologen Implantats genauso wie die Einführung einer entsprechenden Qualitätskontrolle. Hierbei sind für die BioVaSc Qualitätskriterien für die Endotoxin-, DNS- und Zellfreiheit, die Abreicherung der verwendeten Chemikalien sowie die funktionelle Stabilität zu entwickeln. Parallel dazu werden die Qualitätskontrollen für die Zellkultur etabliert. Nach erfolgter Rebesiedlung mit den autologen Zellen sind für die anschließende Qualitätskontrolle, möglichst nicht invasive Tests zu entwickeln. Eine Zusammenfassung der Prozessabläufe der Herstellung und Qualitätskontrolle ist in Abbildung 13 gezeigt.

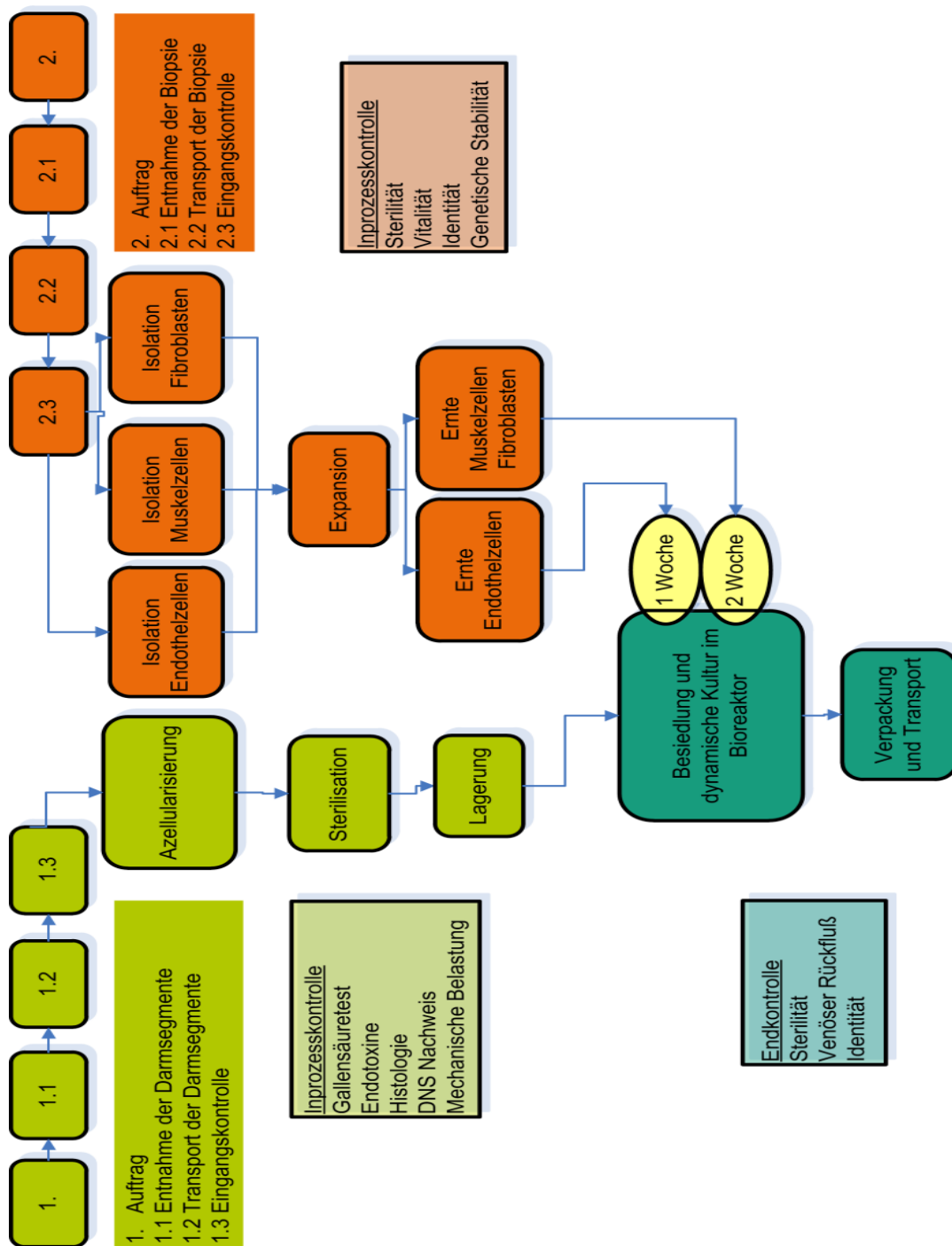


Abbildung 13: Die einzelnen Abschnitte des zu entwickelnden Prozesses. In hellgrün ist die Entnahme der Matrix mit den dazugehörigen Inprozesskontrollen dargestellt. Der orangefarbene Prozessstrom zeigt die Isolation der Zellen mit den zugehörigen Inprozesskontrollen. In grün ist schließlich die Herstellung des ATMP mit den zugehörigen Endkontrollen dargestellt.

2. Materialien

2.1 Xenogenes Material und Biopsiematerial

Porcine Jejunumsegmente wurden in der „Experimentellen Medizin“ des Universitätsklinikums Tübingen von deutschen Landrasseschweinen (10-15 kg) entnommen. Die durchgeführten Organentnahmen fallen unter Abschnitt 3 des Tierschutzgesetzes (§ 4 Abs. 3 TierSchG „Töten von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“) und sind weder anzeige- noch genehmigungspflichtig. Dennoch wurden alle Entnahmen dem Regierungspräsidium Tübingen durch den zuständigen Tierschutzbeauftragten mitgeteilt.

Die Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen stammen aus adulter, humaner Haut verschiedener Körperregionen, wie beispielsweise der Brust, und wurden in der Klinik Charlottenhaus in Stuttgart entnommen (IGB_ZS_F-2012-078). Die Muskelbiopsie-Entnahmen für die Gewinnung humaner Skelettmuskelzellen, fanden in der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen statt und waren durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen (603/2010BO2, 17.1.2011) genehmigt. Die Aufklärung des Patienten sowie die Einholung der Einverständniserklärung lagen in der Verantwortung des operierenden Arztes.

2.1.1 Lösungen für die Azellularisierung

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Benzonase	Merck, Darmstadt	1.016.540.001
MgCl * 6 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	A537.4
Tris	Carl Roth, Karlsruhe	3170.2
<u>Puffer für Benzonase</u> <i>3 g Tris + 0,1g MgCl * 6 H₂O auf 500 ml VE Wasser, pH 8 mit HCl</i>		
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim	10 104 159 001
Natriumdesoxycholat Monohydrat <i>Lösung: 33 g auf 1 Liter VE-Wasser</i>	Sigma Aldrich/ München	238392- 100G
PBS +	Biochrom, Berlin	L1815

2.2 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Caso Abklatschagar	Heipha Dr. Müller, Eppelheim	2284e
Caso Agar-ICR 30ml	Heipha Dr. Müller, Eppelheim	03075e
Caso-Bouillon	Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim	3080r
Dispase I	Roche Diagnostics, Mannheim	4942086001
FibroLife S2 Cell Culture Medium	Lifeline / Cell Technology, Troisdorf	LL-0011
Gentamicin	Biochrom, Berlin	A2712
Kollagenase NB 5/6	Serva, Heidelberg	17459.03/17458.03
PBS-	Biochrom, Berlin	L1825
PBS+	Biochrom, Berlin	L1815
Sabouraud-Glucose Agar	Heipha Dr. Müller, Eppelheim	3540e
Skeletal muscle cell growth medium	ProVitro, Berlin	211 0602
StemPro + 2% FCS	Lifeline / Cell Technology Troisdorf	A10675-01
Thioglycolat-bouillon	Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim	2171r
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	93595
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt	12563-011
VascuLife VEGF-mv Cell Culture Medium	Lifeline / Cell Technology, Troisdorf	LL-0005
Versene	Life Technologies, Darmstadt	15040-033

2.1.3 Reaktortechnik

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Druckdome	HJK Sensoren + Systeme, Merching	844-28
Glasware	Zinstag, Stuttgart	auf Anfrage
Luer-Lock männlich	Neolab, Heidelberg	2-1882
Luer-Lock weiblich	Neolab, Heidelberg	2-1888
Luftfilter	Sartorius Stedim, Göttingen	512-3250
Midisart 2000		
Novaclips 17mm straight	Fumedica Medizintechnik, Hechingen	N-10108
Original Perfusor Spritze 50ml mit luer lock	Braun, VWR International, Darmstadt	613-0120

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Pumpschläuche	Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim	SC0746
Reduzierstück	Neolab, Heidelberg	2-1859
Silicon-Dichtungen	Multimed, Kirchheim/Teck	132923406
Silikonschläuche	Carl Roth, Karlsruhe	9563.1
WILO-Klemme	Neolab, Heidelberg	1-3015
y-Verbinder	Neolab, Heidelberg	2-1854

2.4.0 Testkits und Farbstoffe

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Alexa Fluor® 488 AcLDL	Life Technologies, Darmstadt	L-23380
Fluorescein Diacetat	Life Technologies, Darmstadt	F1303
MTT	SERVA, Heidelberg	20395.03
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	34487-61-1
Propidium Iodid	Life Technologies, Darmstadt	P3566
Total Bile Acid Enzym Test Kit	Diazyme Europe, Dresden	DZ042A-K

2.4.1 Lösungen für die Histologie

Reagenz	Hersteller Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Aquatex	Merck, VWR International, Darmstadt	1.08562.0050
DNS-Färbekit nach Feulgen	Merck, VWR International, Darmstadt	1.107907.001
Eosin B	Sigma-Aldrich, St, Gallen, Schweiz	861006
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe	K928.3
Histofix	Carl Roth, Karlsruhe	P087.4
Isomount	LABOnord, Templemars (B)	05547535
Isomount 2000	LABOnord, Templemars (B)	5547535
Isopropanol	Th.Geyer, Renningen	109634
Mayer's Hematoxylin	Dako, Hamburg	S3309
Methanol	Merck, Darmstadt	8222831000
Roticlear®	Carl Roth, Karlsruhe	A538.1
Slowfad Gold antifad reagent with Dapi	Life Technologies, Darmstadt	S36939
Ultra Pure Wasser	Biochrom, Berlin	L0015

2.5.2 Lösungen für die Antikörperfärbung

Reagenz	Hersteller. Bezugsquelle/Firmensitz	Bestellnummer
Antikörper Diluent	Dako, Hamburg	S3022
DAB Substrat Kit	DCS Innovative Diagnostics Systeme, Hamburg	DC137C100
Duo Vision Plus HRP Kit	DCS Innovative Diagnostics Systeme, Hamburg	PD000DP
EnVision+ System-HRP (DAB)	Dako, Hamburg	K4007
Pap Pen	Dako, Hamburg	S2002
Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg	S2023
	DCS Innovative Diagnostics Systeme, Hamburg	PL019R100
Target Retrieval Solution Citrate pH 6	Dako, Hamburg	S2369
Target Retrieval Solution pH 9	Dako, Hamburg	S2367
Waschpuffer	Dako, Hamburg	S3006:1L

2.5.3 Antikörper

Antigen	Demaskierung	Block	Abstammung	Hersteller	Bestellnummer
CD31	pH 6	Gelantine	Maus	Dako	M0823
Desmin	pH 9	Milchpulver	Maus	Dako	M0760
eNOS	pH 6	Milchpulver	Maus	Abcam	ab66127
Fibroblast/Prolyl- 4-hydroxylase	pH 9	Milchpulver	Maus	Abcam	ab44971
Fibronectin	pH 9	Milchpulver	Ratte	Abcam	ab2501
Heperansulfatpro- teoglycan	Pronase	Milchpulver	Ratte	Abcam	ab2501
IgG	entsprechend	Milchpulver	Maus	Dako	X0931
IgG2a	entsprechend	Milchpulver	Maus	Dako	X0943
Kollagen 1	pH 9	Milchpulver	Maus	Abcam	ab90395
Kollagen 3	Pronase	Milchpulver	Maus	Millipore	MAB3392
MyoD	pH 9	Milchpulver	Maus	Dako	M351201
Myogenin	pH 9	Milchpulver	Maus	Dako	M3559
Myosin	pH9	Milchpulver	Maus	Abcam	Ab94711
PCNA	pH 6	Milchpulver	Maus	Dako	M0879
Vimentin	pH 9	Milchpulver	Maus	Abcam	ab8069
vWF	pH 6	Gelantine	Maus	Dako	M0616

2.6 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle/Firmensitz
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Countess Cell Counting Chamber Slides	Life Technologies, Darmstadt
Deckgläser	Assistent, Sondheim
Einmal Skalpelle	Neolab, Heidelberg
Einmalhandschuhe	Kimtech, Roswell, USA
Einmalspritzen	Multimed, Kirchheim/Teck
Gewebekulturflaschen, 25, 75, 175 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturplatten, 6- und 24-well	Greiner, Frickenhausen
Kaliumchlorid-Lösung	Mettler Toledo, Gießen
Kanülen	Multimed, Kirchheim/Teck
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Lab Tek Chamber-Flasks,	Nunc, Wiesbaden
Objektträger mit Mattrand	LABOnord, Templemars (B)
Objektträgerflaschen	Nunc, Wiesbaden
pH-Pufferlösungen	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten CoStar	Corning, Sigma Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen 100 µl, 200 µl und 1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reinraumbtücher	Dastex, Muggensturm
Safe-Lock-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter, Rotrand 0,2 µm	Schleicher&Schuell, Dassel
Vernichtungsbeutel	Multimed, Kirchheim/Teck
Zellsiebe	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15, 50ml	Greiner, Frickenhausen

2.7 Geräte

Bezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle/Firmensitz
AccuJet	Brand, Wertheim
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Systemec, Wettenberg
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Countess	Life Technologies, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle/Firmensitz
Einbettautomat Citadell 1000	Shandon, Frankfurt am Main
Einbettgeschälchen	Medite, Burgdorf
Einbettzubehör	Medite, Burgdorf
Erlenmeyerkolben, Bechergläser	Schott-Glas, Mainz
Färbetröge	Assistent, Sondheim
Folienschweißgerät	Melag, Berlin
Fotoapparat	Nikon, Düsseldorf
Gefrierschrank -25 °C / -80°C	Kirsch, Offenburg; Heraeus, Hanau
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ, Osterode am Harz
Heizplatte	Medite, Burgdorf
Kühlplatte	Medite, Burgdorf
Kühlschrank	Kirsch, Offenburg
Laborfeinwaage	Satorius, Göttingen
Laborflaschen mit Gewinde	Schott-Glas, Mainz
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Messzylinder	Brand, Wertheim
Mikroskope	Zeiss, Jena Olympus, Hamburg
Paraffin-Gießgerät	Störk Tronic Medax, Kiel
pH-Meßgerät	WTW, Weilheim
Plastik-Bechergläser	Brand, Wertheim
Präparierbesteck	Assistent, Sondheim
Pumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Rotationsmikrotom für Paraffinschnitte	Slee, Mainz
Septophag	Hesse, Emmerich
Shaker	Corning, New York (USA)
Sterilbank	Thermo Scientific, Bonn
Universalwärmeschrank	Memmert, Schwabach
Varipetten	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad für Paraffinschnitte	Medite, Burgdorf
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

3. Methoden

3.1 Herstellung der Matrix

Im Tissue Engineering werden Zellen zur Adhäsie auf Trägergerüsten, sogenannten Matrices, aufgesiedelt und somit in eine dreidimensionale Form gebracht, welche den Zellen eine natürliche Mikroumgebung bieten und die spätere Implantation ermöglichen sollen. In dieser Arbeit wird mit einer porcinen, biologischen, vaskularisierten Matrix (BioVaSc) gearbeitet. Diese ist aus dem Schwein zu entnehmen, die porcinen Zellen sind zu entfernen und die dann zellfreie Matrix ist im Anschluss durch γ -Bestrahlung zu sterilisieren. Der genaue Verlauf ist im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Entnahme der biologisch vaskularisierten Matrix

Die Jejunum Segmente aus 15 - 25 kg schweren Landschweinen, welche zur Herstellung der BioVaSc dienen, werden unter sterilen Bedingungen von der Abteilung für experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Tübingen entnommen. Dazu erhalten die Tiere Heparin, gefolgt von einer Sedierung mit Stresnil, einer zweistufigen Anästhesie und Schmerzdämpfung mit Ketamin sowie Midazolam als Schlafmittel. Die Euthanasie erfolgt im Anschluss mit T61. Nach der Eröffnung des Bauchraums und der Freilegung des Jejunums, wird das Lymphknotengewebe um gut zu präparierende Arterien/Venen Paare mit dem Elektroskalpell entfernt, die zuführende Arterie sowie abführende Vene eines Jejunalabschnittes mit einer Braunüle versehen und das Gefäßsystem mit 0,9% NaCl gespült. Das Darmlumen und die abführenden Gefäße werden abgebunden, so dass ein circa 14 cm langes Stück, die biologisch, vaskularisierte Matrix (BioVaSc) entsteht. Im Anschluss ist das Darmlumen solange mit PBS+ zu spülen bis sich keine Faeces Reste mehr in der Spüllösung befinden. Der Transport der BioVaSc erfolgt gekühlt in einem verschlossenen Plastikbehälter in PBS+ mit 1% Gentamicin, um das bakterielle Wachstum der Darmbakterien zu reduzieren. Die Azellularisierung findet am selben Tag statt. Im Rahmen der Etablierung eines GMP-Prozesses sind die Protokolle zur Entnahme der Matrix erstellt worden.

3.1.2 Bestimmung des maximalen Durchflusses

Das Ziel der Untersuchung ist es, einen Ausgangswert für den venösen Rückfluss und damit die Durchlässigkeit des Gefäßsystems zu bestimmen. Dieser soll zur

Qualitätskontrolle der Matrix verwendet werden. Ausgehend davon, dass der venöse Rückfluss eines geschlossenen Kreislaufsystems 100% beträgt, ist damit zu rechnen, dass ein Explantat einen bestimmten Verlust im Rückfluss aufweist, auch wenn ein komplettes Versorgungsareal eines arteriellen Gewebeastes isoliert wird. Diese Funktionskontrolle kann in der Routineherstellung als Freigabekriterium für die präparierte oder rebesiedelte Matrix Verwendung finden.

Nach erfolgter Präparation wird die entnommene BioVaSc flach gelagert und das Gewicht eines mit PBS+ gefüllten Infusionsbeutels sowie eines Zentrifugenröhrchens bestimmt. Die Braunüle der Arterie ist mit dem Infusionsbeutel zu verbinden und der Durchlauf im Röhrchen aufzufangen. Durch erneutes Wiegen des Beutels und des Gefäßes ist sowohl das Volumen, das aus dem Beutel in das arterielle System eingeleitet wird, als auch das Volumen, das über die Vene wieder ausgetreten ist, bestimmbar.

3.1.3 Azellularisierung der biologisch vaskularisierten Matrix

Im Verlauf dieser Arbeit war ein bereits bestehendes Protokoll zur Azellularisierung der BioVaSc [76-79, 81] an einen GMP-Prozess zu adaptieren, um den regulatorischen Anforderungen für eine Herstellungserlaubnis zu genügen. Dazu wurden der Spülpuffer, die Spülzeiten, die Verwendung von Antibiotika und die enzymatische Behandlung variiert, um die gesetzlichen Grenzwerte an Endotoxin einzuhalten und die Zell- sowie DNS Freiheit zu erreichen.

Der in Abbildung 14 gezeigte Aufbau dient zur Entfernung der porcinen Zellen und damit zur Azellularisierung der Matrix. Diese wird in das Reaktorsystem eingespannt und die Azellularisierungslösung sowohl über das Gefäßsystem als auch über das Darmlumen zugeführt. Dies geschieht unter ständiger Druckkontrolle, um das Gefäßsystem nicht durch unphysiologische Drücke zu beschädigen (Abbildung 14).

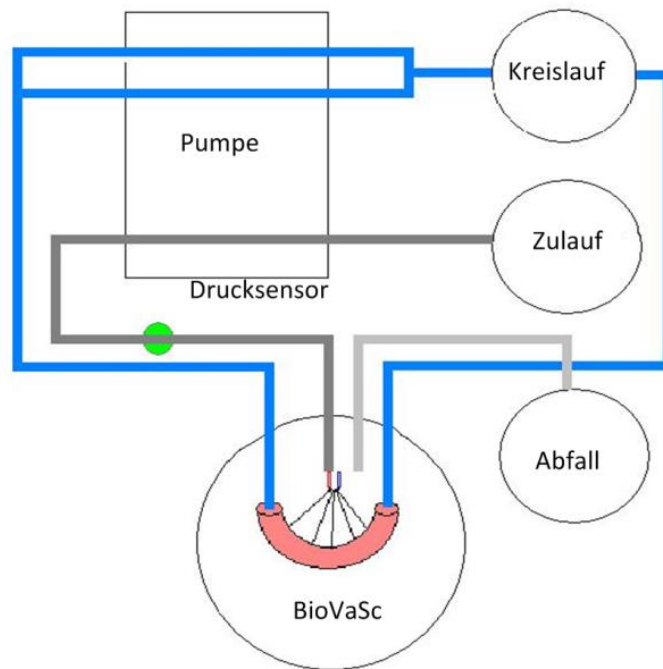


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Matrixherstellung. Dieser ermöglicht mit einer Pumpe, drei Versorgungsflaschen und zwei Kreisläufen die parallele Azellularisierung der vaskulären Strukturen und des Darmlumens. Am arteriellen Zugang wird der Druck des zulaufenden Fluids erfasst.

Pro BioVaSc werden 500 ml frisch angesetzte Azellularisierungslösung über das Gefäßsystem und 250 ml der Lösung über einen geschlossenen Kreislauf durch das Lumen gepumpt. Dabei ist die Fließgeschwindigkeit so zu regulieren, dass die Amplitude 100 mmHg nicht übersteigt. Das Natriumdesoxycholat in der Lösung sorgt dabei für die Zellyse und die entstandenen Zelltrümmer werden durch das Spülen mit 1 Liter 4°C kalten PBS+ entfernt. Dabei ist der Fluss so zu regulieren, dass die Amplitude 120 mmHg nicht übersteigt. Zusätzlich sind sowohl der Reaktor als auch die Lösungen zu kühlen, um das bakterielle Wachstum zu reduzieren. Während des Spülvorgangs sollten, nach einem Durchfluss von 250 ml, Gewebetrümmer manuell entfernt werden. Durch dieses Verfahren entfärbt sich die BioVaSc und erscheint durch die Lyse und den Abtransport der porcinen Zellen und Blutreste weiß. Diese Entfärbung gibt einen ersten makroskopischen Hinweis auf eine erfolgreiche Azellularisierung. Das Lumen der Matrix und die Gefäße werden im Anschluss mit Hilfe einer Spritze mit der Azellularisierungslösung gefüllt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag ist die BioVaSc erneut in das gekühlte Reaktorsystem einzuspannen und mit 2 Litern 4°C kaltem PBS+ zu spülen. Hierbei gelten die Druckbestimmungen vom Vortag. Dies ist in Abbildung 15 grafisch dargestellt.

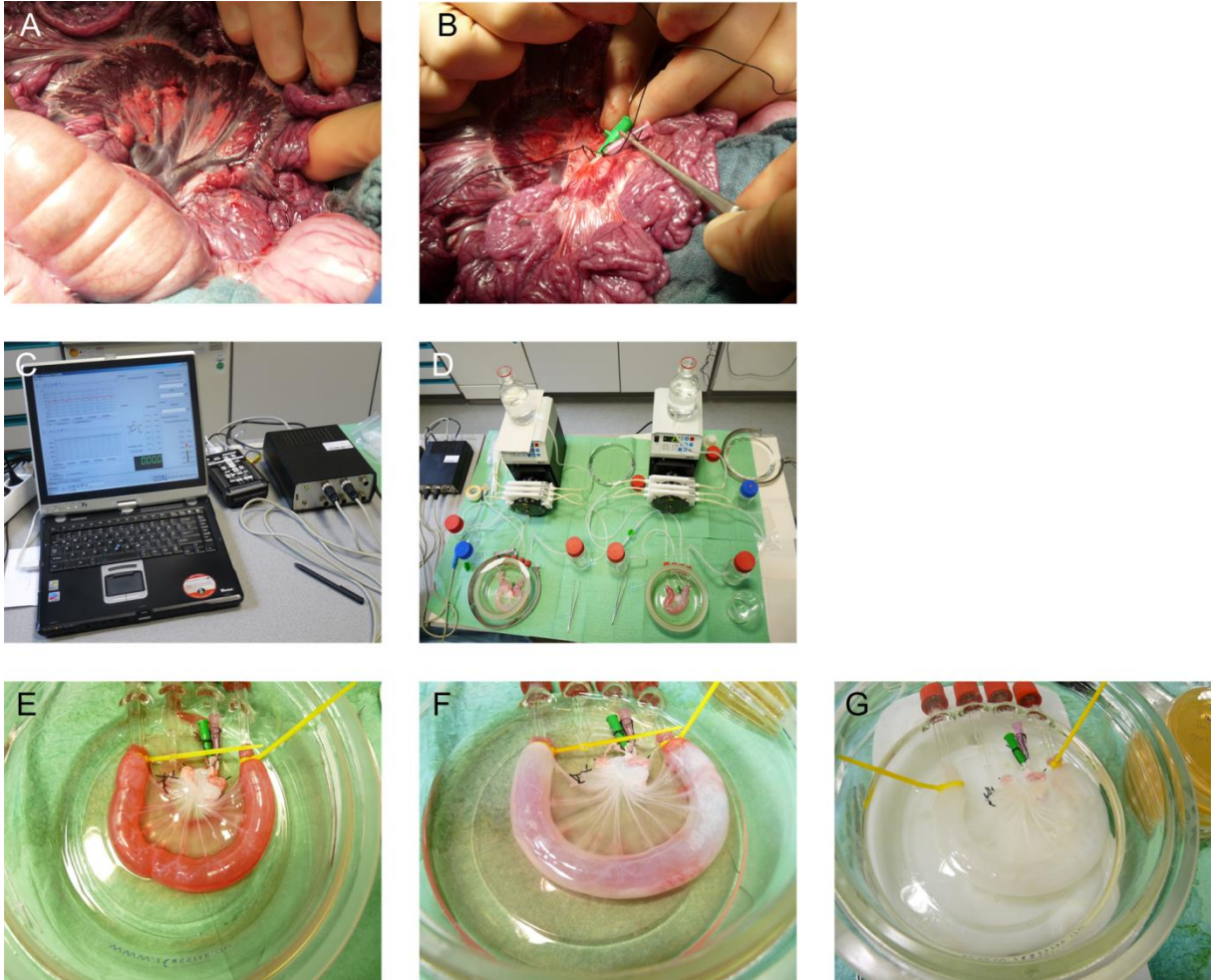


Abbildung 15: (A) und (B) Entnahme der Matrix; (C-D) Der PC und die Messgeräte zur Druckkontrolle sowie der Aufbau der Azellularisierung; (E-G) Entfärbung der Matrix durch Entfernung der porcinen Zellen über die Dauer der Azellularisierung

DNS und auch RNS Reste werden mit Hilfe der Inkubation in einer Benzonase Lösung aus der BioVaSc entfernt. Hierzu wird die BioVaSc eine Stunde in TRIS-Puffer äquilibriert und für die noch vorhandene restliche DNS 2 h bei 37°C mit 100 U/ml Benzonase in einem Gesamtvolumen von 200 ml verdaut. Hierbei ist auch das Lumen mit Benzonase zu füllen. Im Anschluss wird die Matrix bis zur Sterilisation durch γ -Bestrahlung für 48 Stunden bei 4°C mit PBS+ gewaschen. Die Spüllösung ist zweimal täglich auszutauschen. Die Sterilisation erfolgt bei 25 kGy durch einen Kobaltstrahler (BBF Steriexpert, Kernen, Deutschland). Bevor die BioVaSc bei 4°C gelagert wird ist sie in frisches PBS+ zu überführen. Die Proben zur Bestimmung der Gallsäure- und Endotoxinkonzentrationen (Abschnitt 3.4.2.1 - 3.4.2.2) sind nach folgender Auflistung zu entnehmen und bei -20°C zu lagern.

Die Proben werden nach:

- der Azellularisierung
- dem Waschschrift mit 1000 ml PBS+
- der Nacht in Azellularisierungslösung
- dem Waschschrift mit 2000 ml PBS+
- der enzymatischen DNS Degradation
- vor und nach Sterilisation gezogen.

Die Proben für die histologische Untersuchung (Abschnitt 3.4.1) werden zu folgenden Zeiten entnommen:

- vor bzw. nach der Azellularisierung
- nach der DNS Degradation
- vor und nach Sterilisation

Die Herstellung der azellularisierten BioVaSc dauert insgesamt fünf Tage.

3.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen werden unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Luft in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

3.2.1 Isolation der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen, adulten, primären Endothelzellen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten werden aus Haut und Muskelproben verschiedenster operativer Eingriffe isoliert.

3.2.1.1 Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen aus adulter Haut

Als Endothel werden die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen der innersten Wandschicht von Lymph- und Blutgefäßen bezeichnet. Es ist in eine Vielzahl verschiedenster physiologischer Prozesse eingebunden und abhängig von ihrer Herkunft weisen die Zellen unterschiedliche Eigenschaften auf. In dieser Arbeit werden mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEC) aus adulter Haut verwendet.

Die Aufarbeitung der Haut erfolgt am gleichen oder spätestens einen Tag nach der Entnahme. Zunächst ist das Gewebe vollständig vom Fett zu befreien und mit PBS+ zu spülen, um die bakterielle Belastung zu reduzieren. Dann erfolgt die Zerkleinerung

in 3 mm große Streifen, welche wahlweise über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in 2 U/ml Dispase Lösung inkubiert werden. Anschließend lassen sich Dermis und Epidermis mit Hilfe von Pinzetten voneinander trennen. Die Epidermis ist zu verwerfen, die Dermis für 40 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ enzymatisch mit Trypsin zu verdauen und die Reaktion im Anschluss mit 15 % Medium abzustoppen. Danach sind die Streifen der Dermis in vorgewärmtes Endothelzellmedium zu überführen. Jeder Streifen wird unter leichtem Druck von allen Seiten ausgestrichen und die entstandene Zell-Medium-Suspension über ein 100 µm Zellsieb gegeben, um vorhandene Geweberückstände zu entfernen. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten. Die gewonnenen Zellen werden mit einer Dichte von 30.000 - 40.000 Zellen pro cm² ausgesät. Zur Vermeidung der Kontamination mit Fremdzellen erfolgt am nächsten Morgen eine maximal 10 minütige Inkubation mit Versene, ein Waschschriff mit PBS+ und ein Medienwechsel. Dieser Schritt kann nach mikroskopischer Kontrolle im Verlauf der Zellkultur wiederholt werden, wenn noch Fremdzellen vorhanden sind. In den ersten 7 Tagen ist eine Zugabe von 1% Gentamicin zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen notwendig. Bei Patientenmaterial erfolgen im Rahmen des GMP die Vergabe einer Identifikationsnummer sowie die unabhängige Kontrolle der Qualität in Bezug auf die Morphologie und die Kontamination des Transportmediums.

3.2.1.2 Isolation der Fibroblasten aus humaner, adulter Haut

Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Synthese der extrazellulären Matrix spielen. Zusätzlich bilden sie eine Vielzahl von Stoffen, wie z.B. den Hepatocyten-, Epidermalen- oder Keratinozyten-Wachstumsfaktor [110]. Viele Zellen sind von diesen Stoffen abhängig und zeigen in einer Co-Kultur mit Fibroblasten eine gesteigerte Proliferation beziehungsweise Differenzierung.

Zur Isolierung von Fibroblasten kann die Dermis aus der Endothelzellisolation weiter verwendet werden. Diese ist zu zerkleinern, in ein Zentrifugationsröhrchen zu überführen und für 18 Stunden bei 37°C enzymatisch mit 0,5 PZ-Unit/ml Kollagenase Typ 1 zu behandeln. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 200g folgt ein Waschschriff mit 5 ml Medium und die Aussaat des Verdaus in eine 75 cm² Flasche. Am nächsten Tag erfolgt ein Medienwechsel.

3.2.1.3 Isolation der Muskelzellen aus humanem Muskelgewebe

Skelettmuskeln sind für die willkürlichen, aktiven Körperbewegungen zuständig. Sie bestehen aus Muskelfasern und werden von einer sehr festen Bindegewebsschicht, der Faszie, eingehüllt. Um eine reine Muskelzellkultur zu erhalten, ist es deshalb notwendig, zunächst alle Anteile der Faszie gründlich zu entfernen, da ansonsten eine erhöhte Beimengung von Fremdzellen zu erwarten ist. Im Anschluss sind die Muskelfasern in 2 mm³ große Würfel zu zerteilen und für 40 Minuten mit 1 ml Trypsin pro 1 cm² Muskel im Brutschrank zu inkubieren. Danach ist der Verdau durch Zugabe von 15 % Medium abzustoppen, die Lösung über ein 100 µm Zellsieb zu filtrieren und bei 200 g für 5 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wird im Anschluss abgenommen, das Pellet in 3 ml Skelettmuskelmedium suspendiert und auf 25 cm² ausgesät. Am nächsten Tag ist ein vollständiger Medienwechsel durchzuführen, wobei in den ersten 7 Tagen 1 % Gentamicin zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen zugegeben wird. Bei Patientenmaterial erfolgt, genauso wie bei den Hautbiopsien, die Vergabe einer Identifikationsnummer und eine unabhängige Kontrolle der Sterilität.

3.2.1.4 Mesenchymale Stammzellen

Für die autologe Zellspende wäre außer der Entnahme von Haut und Muskelbiopsien auch die Stammzellspende geeignet. Hierfür werden mesenchymale Stammzellen mit Hilfe des Sepax-Geräts der Firma Biosafe aus Knochenmarkaspirat gewonnen. Der Lieferant war hierbei die Firma Poetics (USA).

Die primäre Aussaatdichte beträgt hierbei 120.000 Zellen/cm². Die Besiedlung erfolgt nach den in Abschnitt 3.3.1 benannten Verfahren mit 1,5 - 20 Millionen Zellen.

3.2.1.5 Upcyte mvEC

Upcyte[®] mvEC sind genetisch veränderte primäre Zellen der Firma Medicyte. In diesen Zellen werden mit Hilfe eines viralen Transfersystems die entsprechenden Proliferationsgene hochreguliert und die primären Endothelzellen zu einer gesteigerten Teilungsrage gebracht. Hierbei behalten sie ihre typische Differenzierung ohne immortalisiert zu werden. Diese Zellen wurden in einer Doktorarbeit von der Firma Medicyte etabliert und zur Besiedlung der BioVaSc zur Verfügung gestellt [111]. Mit diesen Zellen ist es möglich, die Spendervarianz auszuschließen und somit davon unabhängige Ergebnisse zu generieren. Hierfür werden zwischen 20 - 30

Millionen Zellen mit Hilfe einer Spritze in die verbliebenen vaskulären Strukturen der Matrix eingebracht und unter den in Abschnitt 3.3.1 und 4.6 genannten Bedingungen kultiviert.

3.2.2 Subkultivierung der Zellen

Die Subkultivierung der Zellen erfolgt bei einer Konfluenz von 80%. Hierfür wird das Medium aus der Flasche entfernt, dann die Zellen mit PBS- gespült und im Anschluss 3 - 5 ml vorgewärmte Trypsin/EDTA Lösung für 3 Minuten zugegeben. Die Reaktion ist durch Zugabe von Zellkulturmedium abzustoppen und die Zellsuspension bei 200 g, 5 min, RT zu zentrifugieren. Das Zellpellet lässt sich dann in frischem Medium resuspendieren und im Anschluss mit 3000 - 5000 Zellen pro Quadratzentimeter aussäen.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung erfolgt die Entnahme von 20 µl aus der unter 3.2.2 gewonnen Zellsuspension und die Verdünnung mit 20 µl Trypanblau-Lösung. Trypanblau dringt durch die Zellmembran toter Zellen ein und färbt diese blau. 10 µl der Zellsuspension werden unter das Deckglas einer Neubauerkammer pipettiert und mit Hilfe des Zellzählgerätes Countess der Firma Invitrogen die Anzahl lebender bzw. toter Zellen bestimmt. Dieses Gerät verwendet die Trypanblaufärbung in Kombination mit einem Algorithmus zur Bildanalyse und nimmt eine automatische Bestimmung der Zellzahl und Vitalität vor. Die Erkennung von lebenden und toten Zellen sowie die Helligkeit und Schärfe sind für jeden Zelltyp einstellbar. Dadurch kann das System mit anderen Methoden, wie beispielsweise der manuellen Zählung, abgeglichen und validiert werden. Dies hilft, den Prozess unabhängig von der durchführenden Person zu gestalten und sorgt für reproduzierbare Daten.

3.3 Herstellung eines vaskularisierten, autologen Implantats

Zur Herstellung des autologen Implantats werden die mikrovaskulären Endothelzellen, Muskelzellen und Fibroblasten in die azellularisierte Matrix eingebracht und für zwei Wochen in einem speziell dafür angefertigten Bioreaktorsystem (Abschnitt 4.6) kultiviert. Vor der Verwendung wird die BioVaSc mit 4 ml gesättigter Phenolrotlösung mit Hilfe eines Infusomators (60 ml/h) angespült, um eventuelle Blockaden und undichte Stellen des Gefäßsystems zu erkennen. Da Phenolrot in vielen Zellkulturmedien eingesetzt wird, ist kein toxischer Effekt auf die

Zellen zu erwarten. Nur Matrices, bei denen sich das gesamte Gefäßsystem darstellt, können besiedelt werden (Abbildung 16).

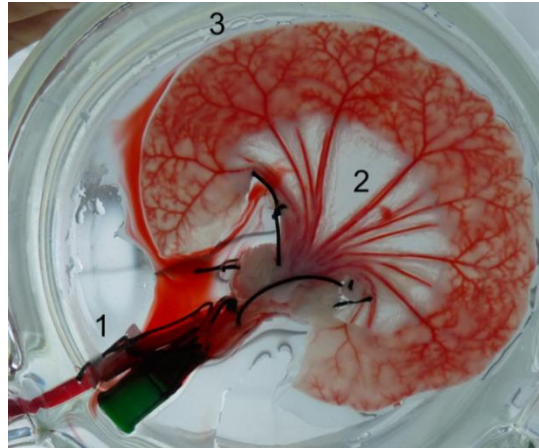


Abbildung 16: Mit Phenolrot gespülte BioVaSc; (1) arterieller Zugang (2) zuführende Venen/Arterien (3) Gefäßast

3.3.1 Besiedlung und Kultur der Matrix

Die Besiedlung der Matrix soll die BioVaSc mechanisch stabilisieren, das Remodeling ermöglichen, die Bildung von Thromben verhindern und die Abstoßungsreaktion des Empfängers nach Implantation unterdrücken. Dadurch soll die Narbenbildung reduziert und schwere Stenosen im Bereich der Trachea verhindert werden. Zusätzlich kann es bei nicht besiedelten Implantaten durch die Einlagerung von Kalzium [112], zu Problemen beim Einwachsen kommen.

Für das in dieser Arbeit entwickelte autologe Implantat wurden mikrovaskuläre Endothelzellen (Abschnitt 3.2.1.1), Fibroblasten (Abschnitt 3.2.1.2) und Skelettmuskelzellen (Abschnitt 3.2.1.3) isoliert. Die Endothelzellen sind in die vorhandene Gefäßstruktur (Abschnitt 3.3.1.1) und die Fibroblasten sowie Skelettmuskelzellen in das Lumen (Abschnitt 3.3.1.2) eingebracht worden (Abbildung 17).

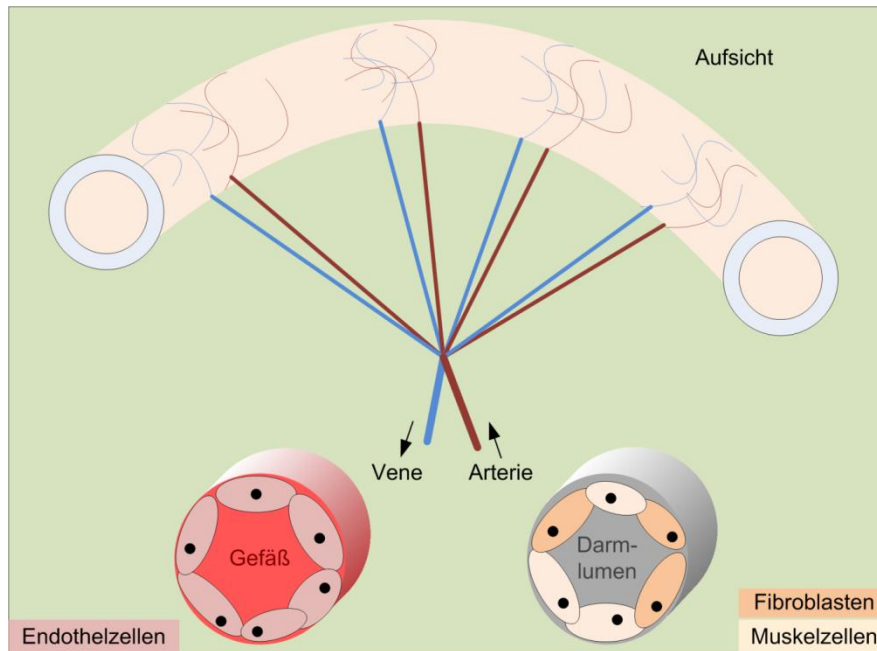


Abbildung 17: Rebesiedlung der biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc): Die Endothelzellen werden in die vorhandenen vaskulären Strukturen eingebracht, die Muskelzellen und Fibroblasten kleiden das Lumen des Darms aus.

3.3.1.1 Besiedlung des Gefäßsystems

Eine effizientere bzw. großflächigere Besiedlung der Matrix durch Endothelzellen sollte parallel zur Standardisierung unter GMP-Bedingungen erfolgen und die hierfür nötigen Protokolle entwickelt werden. Im Rahmen der Entwicklung ist die BioVaSc unter Verwendung von Einmalspritzen rebesiedelt worden. Hier besteht die Möglichkeit einer starken Schwankung des Drucks und des erzeugten Einstroms abhängig von der durchführenden Person. Da das Verfahren davon unabhängig zu gestalten war, wurde die Verwendung eines Infusmators etabliert, um konstante Fluidströme zu garantieren (Abbildung 18).

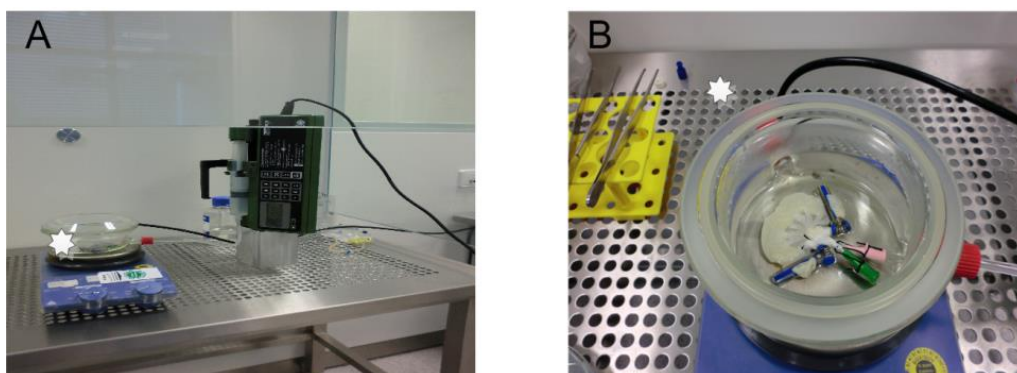


Abbildung 18: (A) Infusomotor zur Besiedlung des Blutgefäßsystems mit mikrovaskulären Endothelzellen (B) zugeklebte und erwärmte BioVaSc in einem Besiedlungsreaktor

Die BioVaSc ist über Nacht bei 4°C in Endothelzellmedium zu äquilibrieren und im Anschluss auf 37°C zu erwärmen. Die Gefäße sind dann in zwei Schritten zu besiedeln. Hierfür werden insgesamt 20–30*10⁶ mikrovaskuläre Endothelzellen aus der entsprechenden Anzahl Flaschen, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, geerntet. Nach dem Einstellen der Zellzahl auf einer Million Zellen pro Milliliter und dem Verschließen des Lumens mit Hilfe von Klemmen, um offene Gefäße am Rand der BioVaSc abzudichten und so Zellverluste zu verringern, erfolgt die Rebesiedlung der Matrix. Dazu wird die Suspension bei einem Fluss von 60 ml/h mit Hilfe einer Spritzenpumpe in den arteriellen Zugang injiziert. Zur Besiedlung liegt die BioVaSc flach in einem Glasreaktorsystem, wobei die Temperatur des Mediums 37°C beträgt. Im Anschluss erfolgt die Besiedlung des venösen Systems. Hierzu wird das im Bioreaktor aufgefangene Medium bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, die enthaltene Zellzahl bestimmt (Abschnitt 3.2.3) und mit einer Konzentration von einer Millionen Zellen pro Milliliter mit Hilfe des Infusomators in den venösen Zugang eingebracht. Falls vorhanden, können hierfür auch frische Endothelzellen verwendet werden. Hierbei gelten die gleichen Bedingungen wie bei der arteriellen Besiedlung. Das Medium wird nach erfolgter Besiedlung aus dem Reaktor entnommen und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wird die besiedelte BioVaSc in den mit Endothelzellmedium gefüllten sowie vorgewärmten Kultivierungsbioreaktor überführt und der pulsatile Druck innerhalb von 12 Stunden von 10 mmHg auf 120 mmHg gesteigert. Die langsame Steigerung des Drucks ist notwendig, um die mikrovaskulären Endothelzellen langsam an die physiologischen Drücke zu adaptieren ohne sie dabei auszuspülen, und sorgt für körpernahe Kultivierungsbedingungen. Am nächsten Tag erfolgt eine erneute Besiedlung mit Endothelzellen nach den oben genannten Schritten, um die Besiedlungsdichte mit mikrovaskulären Endothelzellen zu erhöhen. Im Anschluss sind die Klemmen vom Lumen zu entfernen, da sich ansonsten zwischen der Matrix und der Serosa Flüssigkeit sammelt und diese sich ablöst.

3.3.1.2 Besiedlung der luminalen Seite

Nach einwöchiger Kultur erfolgt die Besiedlung der luminalen Seite. Hierfür werden je 10 Millionen Skelettmuskelzellen und Fibroblasten wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, geerntet. Nach dem Verschluss eines Endes des Darmlumens mit einer sterilen Klemme sind die in 5 ml Endothelzellmedium gemeinsam resuspendierten

Zellen, mit Hilfe einer Pipette einzubringen. Anschließend ist die andere Seite der Matrix ebenfalls zu verschließen und diese in den Bioreaktor zu überführen. Damit die Besiedlung beider Seiten des Lumens sichergestellt ist, wird die Matrix nach drei Stunden gewendet. Die Klammern am Darmlumen sind am nächsten Tag zu entfernen und das autologe Implantat für eine weitere Woche im Bioreaktorsystem zu kultivieren.

Während der Kultur erfolgt alle 3 - 4 Tage ein Medienwechsel. Nach Abbruch der Kultivierung wird der Durchfluss nach Abschnitt 3.1.2 bestimmt.

3.4 Nachweismethoden zur Qualitätskontrolle

Die „Good Manufacturing Practice“ beinhaltet verschiedenste Richtlinien zur Qualitätssicherung von Produktionsabläufen und deren Umgebung. Da Abweichungen von diesen Normen direkte Auswirkungen auf die Gesundheit des Patienten haben können, wird in hohem Maße auf die Qualität geachtet und diese kontrolliert. Für jeden Prozess müssen neue, sichere Maßnahmen zur Qualitätskontrolle entwickelt werden. In der Pharmacopeia, dem europäischen Arzneibuch, sind eine Vielzahl pharmazeutischer Regeln zur Prüfung, Bezeichnung, Lagerung und auch der Qualität von Arzneimitteln zusammengefasst. Ebenso sind darin die Herstellung und Prüfung der dazu benötigten Stoffe, Materialien und Methoden beschrieben. Im Rahmen der Entwicklung eines Arzneimittels für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Product = ATMP) sind diese möglichst weitgehend zu adaptieren. In der vorliegenden Arbeit waren Methoden bzw. Analysen zur Ermittlung der enthaltenen Endotoxine, des verbliebene DNS-Gehalts, das Auswaschen der verwendeten Chemikalien, histologische Färbungen sowie die mechanische Stabilität zur Qualitätskontrolle der azellularisierten Matrix zu etablieren und soweit möglich zu validieren. Für die Qualitätskontrolle des autologen Implantats waren Methoden der Zellcharakterisierung, immunhistologische Färbungen sowie verschiedene Möglichkeiten der Vitalitätsbestimmung festzulegen.

3.4.1 Histologie

In der Histologie werden Gewebeschnitte hergestellt, gefärbt und am Mikroskop beurteilt.

3.4.1.1 Herstellung und Vorbereitung der Proben

Fixierung

Für die Einbettung in Paraffin sind die Proben zunächst in Histofix zu fixieren. Dies dient der Stabilisierung der strukturellen Form der Zellen und der Matrix, da sie Eiweißmoleküle quervernetzt. Die Fixierung in Histofix erfolgt für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wird das Präparat für zwei Stunden gewässert, um überschüssiges Fixiermittel zu entfernen.

Infiltration

Die Infiltrierung mit Paraffin dient der Härtung des Gewebes, da es sonst beim Schneiden deformiert werden würde. Dazu erfolgen zunächst das Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und eine anschließende Überführung in Paraffin. (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Einbettprogramm

Lösung	Zeit [h]
Leitungswasser I	1
Leitungswasser II	1
70% Ethanol (V/V) %	1
90% Ethanol (V/V) %	1
96% Ethanol (V/V) %	1
Isopropanol I	1
Isopropanol II	1
Xylol / Isopropanol 1:1	1
Xylol	1
flüssiges Paraffin I	3
flüssiges Paraffin II	3

Nach Durchführung des Programms werden die Kassetten in 61°C warmes Paraffin überführt, nacheinander geöffnet und das Präparat entnommen. Dieses wird im Anschluss auf der Heizplatte mit dem Skalpell zerteilt. Die Schnittkante wird danach in einer mit Paraffin gefüllten Metallplatte ausgerichtet und die Blöcke nach der Aushärtung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Anfertigen der Schnitte

Zunächst sind die Paraffinblöcke für 30 Minuten bei -10°C zu kühlen. Zur Herstellung einer glatten Schnittfläche werden dann einige Trimmschnitte mit $30\ \mu\text{m}$ angefertigt, anschließend $3\ \mu\text{m}$ Feinschnitte produziert und in ein Streckbad mit einer Temperatur von 38°C überführt. Im Anschluss können die Schnitte auf Objektträger gezogen und bei 42°C auf einer Wärmeplatte getrocknet werden. Für die Antikörperfärbung verwendete Schnitte sind über Nacht bei 37°C im Brutschrank zu trocknen, da sie sich ansonsten während der Färbung leicht vom Objektträger ablösen.

Entparaffinieren

Für die Färbung ist es notwendig, die Paraffinschnitte zu entparaffinieren, um die Bindungsstellen für Farbstoffe und Antikörper freizulegen. Dazu wird das Paraffin zunächst für 30 Minuten bei 61°C angeschmolzen, im Anschluss wird das Präparat in einer absteigenden Alkoholreihe in die wässrige Phase überführt (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Schritte der Entparaffinierung

Arbeitsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
Aufschmelzen des Paraffins im Trockenschrank	$61\ \text{C}^{\circ}$	30
Ablösen des Paraffins im Roticlear I	RT	10
Vollständiges Entfernen des Paraffins in Roticlear II	RT	3
Wässern des Präparats in absteigender Ethanolreihe 96% I 96% II 70% 50%	RT	je 2
Waschen in VE Wasser	RT	2

3.4.1.2 Hämalaun/Eosin Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist ein Färbeverfahren in der Histologie, mit dem verschiedenen Strukturen eines Gewebes angefärbt werden können. Hämalaun färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau,

insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNS) und das raue Endoplasmatische Retikulum (rER).

Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot an. Das betrifft vor allem die Zellplasmaproteine.

Paraffinschnitte sind zunächst, wie in Tabelle 2 beschrieben, zu entparaffinieren.

Die Färbung erfolgt durch das Eintauchen in die Färbelösung nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Verfahren.

Tabelle 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lösung	Zeit [min]
Inkubation der Objektträger in Mayer´s Hämalaunlösung	8
Objektträger unter fließendem Wasser spülen bis die Lösung klar erscheint	3
Differenzierung mit 0,25% (V/V) HCl / 50% (V/V) Ethanol	0,5
Schwenken der Objektträger in frischem VE Wasser	1
Bläuen der Schnitte mit Leitungswasser	5
Gegenfärben durch Inkubation in 1% (V/V) angesäuerter Eosinlösung	1
Objektträger unter fließendem Wasser spülen bis die Lösung klar	3
Differenzierung in 70% (V/V) Ethanol	1
Entwässern der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe:	
Inkubation in 96% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in 98% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in Isopropanol I	5
Inkubation in Isopropanol II	5

Nach der Färbung erfolgt das Eindecken mit je 200 µl Isomount.

3.4.1.3 Immunhistologie

Bei Paraffinschnitten bedarf es zunächst einer Entparaffinierung, wie in Tabelle 2 beschrieben. Im Anschluss erfolgt eine Demaskierung der Epitope, wobei die bei der Fixierung entstandenen Proteinquervernetzungen teilweise wieder aufgebrochen werden. Dazu sind die Schnitte, abhängig vom verwendeten Primärantikörper, zunächst entweder im Dampfgarer für 45 Minuten in Retrieval Solution pH 6,0 bzw.

pH 9,0 zu erhitzen oder enzymatisch zu behandeln. Zur enzymatischen Epitopdemaskierung werden die Schnitte mit dem PapPen umkreist, welcher eine hydrophobe Barriere um den zu färbenden Bereich erstellt und so dass Enzym an der gewünschten Stelle hält. Im Anschluss erfolgt die 12 minütige Inkubation mit Pronase bei Raumtemperatur und die Überführung der Schnitte in Waschpuffer. Danach erfolgt bei den Antikörpern gegen CD31 und vWF ein Blockschritt gegen unspezifische Bindungen mit 0,05% Gelantine in Waschpuffer für 30 Minuten. Die restlichen Antikörper werden mit 5% Milchpulver für 30 Minuten in Waschpuffer inkubiert.

Die Zellkulturen werden für 5 Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert und nach dem Trocknen bei - 20°C gelagert. Vor der Färbung sind sie für 5 Minuten in Waschpuffer zu rehydrieren.

In der Immunhistologie werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Damit ist es möglich, zu bestimmen, in welchen Geweben und in welchem Zellkompartiment das Protein vorhanden ist. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop, wobei es zwischen Antikörper und Antigen zu einer starken und spezifischen Bindung kommt. Die verwendeten Antikörper werden mit dem Antikörperdiluent, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, verdünnt. Damit die Färbung überprüft werden kann, ist es nötig, eine entsprechende positive Kontrolle, z.B. natives Gewebe, sowie eine negative Kontrolle mitzuführen. Hierzu dient ein Antikörper der sowohl die gleiche Isotypenklasse aufweist, als auch aus dem gleichen Tier wie die verwendeten Primärantikörper stammt. Er wird in der am höchsten eingesetzten Konzentration verwendet und darf keine Färbung aufweisen. Die Bindung kann im Anschluss über ein gekoppeltes Detektionssystem sichtbar gemacht werden. Dieses System ist in der Regel an einen Sekundärantikörper gebunden und bindet über diesen spezifisch an den Primärantikörper. Das hier verwendete EnVision System besteht aus einem Dextrangerüst, an welches sowohl die Sekundärantikörper als auch das Detektionssystem, in diesem Fall eine Meerrettichperoxidase, gekoppelt sind. Durch den Einsatz des Dextrangerüsts mit den gekoppelten Enzymen kommt es zur Verstärkung des von einem Primärantikörper ausgelösten Signals. Die Sichtbarmachung erfolgt durch die Zugabe des Chromogens, welches zunächst fast farblos ist. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat für die

Meerrettichperoxidase kommt es zum Freiwerden von Protonen, welche das Chromogen oxidieren und in ein braunes Endprodukt umwandeln. Zur besseren Darstellung der Zellen erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun, welches die Zellkerne blau anfärbt. (Tabelle 4)

Tabelle 4: Antikörperfärbung

Arbeitsschritt	Zeit[min]
Blocken unspezifischer Bindungsstellen durch Beschichtung der Objektträger mit Peroxidase-Blocker	5
Waschen der Schnitte mit Waschpuffer	2
Überschichten mit dem Primärantikörper	60
3 x Waschen in Waschpuffer	je 2
Zugabe des Sekundärantikörpers	30
3 x Waschen in Waschpuffer	je 2
Zugabe von je einem Tropfen Chromogen (mit Substratpuffer 1/50 verdünnt)	5
Spülen mit Waschpuffer	1
Spülen mit dest. Wasser	1
Gegenfärbung mit Hämalaun	0,25
Waschen mit dest. Wasser	1
Bläuen in Leitungswasser	5
Entwässern der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe	
Inkubation in 96% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in 98% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in Isopropanol 1	5
Inkubation in Isopropanol 2	5

Bei Objektträgern aus Glas erfolgt dann das Eindecken mit 200 µl eines nicht wässrigen Eindeckmittels (Isomount). Bei Objektträgern aus Kunststoff muss ein wässriges Eindeckmittel (Aquatex) verwendet werden, da es ansonsten zur Verformung des Materials der zellkulturgeeigneten Objektträger durch die Lösemittel des nicht wässrigen Eindeckmittels kommt.

3.4.1.4 Auszählung der Zellkulturen

Die Immunhistologischen Färbungen der Zellkulturen können mit Hilfe des Programms Cell A von Olympus ausgezählt werden. Dazu wird an drei repräsentativen Stellen ein Foto der Zellkultur gemacht und jede positive Zelle markiert. Das Programm bestimmt dann automatisch die Anzahl der markierten Zellen.

3.4.1.5 DNS-Färbung nach Feulgen

Die DNS-Färbung nach Feulgen ist eine spezifische Methode, um Desoxyribonukleinsäuren (DNS) in histologischen Schnitten anzufärben. Zunächst erfolgt eine saure Hydrolyse, welche die Bindung zwischen den Basen und der Desoxyribose auflöst. Dabei kommt es zum Freiwerden der endständigen Aldehydgruppen. Diese reagieren mit dem zugegebenen Schiff'schen Reagenz unter Bildung eines rosa Farbstoffes, welcher mikroskopisch ausgewertet werden kann. Die DNS-Färbung nach Feulgen erfolgte mit dem Kit der Firma Merck. Zunächst sind die Proben, wie in Tabelle 2 beschrieben, zu entparaffinieren. Das weitere Vorgehen erfolgt wie in Tabelle 5 dargelegt.

Tabelle 5: DNS-Färbung nach Feulgen

Lösung	Zeit [min]
Rehydrieren der Proben	10
Inkubation der Objektträger in Salzsäure bei 22°C	50
Objektträger zweimal in VE Wasser waschen	je 2
Inkubation der Objektträger in Schiff'schem Reagenz	60
Objektträger zweimal mit Natriumdisulfitlösung waschen	je 3
Objektträger zweimal in VE Wasser waschen	je 2
Entwässern der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe	
Inkubation in 96% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in 98% (V/V) Ethanol	2
Inkubation in Isopropanol 1	5
Inkubation in Isopropanol 2	5

Nach der Färbung erfolgt das Eindecken mit 200 µl Isomount je Objektträger.

3.4.2 Spezielle Nachweise zur Analyse der Matrix nach der Azellularisierung

Zusätzlich zur Histologie wurden noch weitere Methoden zur Analyse der Matrix etabliert. Diese sind im Folgenden beschrieben.

3.4.2.1 Endotoxinmessung

Endotoxine sind Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Sie sind in der Lage, Fieber zu erzeugen und aktivieren verschiedenste Signalwege, welche zu Apoptose oder Entzündungen führen können. In der Pharmacopeia ist der zulässige Grenzwert bei 0,25 EU/ml festgelegt. Die derzeit empfindlichste Methode zur Messung der Endotoxine ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade im Lysat von Amöbozyten, welche aus *Limulus polyphemus* gewonnen wird. Für die Gewinnung des Lysats wird den Tieren ein Teil ihrer Hämolymphe entnommen und diese aufgearbeitet. Bakterielle Endotoxine rufen im Limulus-Amoebocyten-Lysat eine leicht zu erkennende Trübung hervor. In der Pharmacopeiae sind verschiedene Methoden zur Endotoxinprüfung beschrieben. In diesem Fall ist die turbidimetrisch-kintetische Methode verwendet worden. Hierbei wird mittels eines Photometers die Reaktionszeit zum Eintritt einer definierten Trübung bestimmt. Diese Analysen wurden im Rahmen der Arbeit von der Firma BioChem aus Karlsruhe nach GMP-Standards durchgeführt und ausgewertet.

3.4.2.2 Analyse des Azellularisierungsdetergenz

Zur Entfernung der porcinen Zellen aus der Matrix wird Natrium-Desoxycholat verwendet. Diese Gallensäure lysiert die Zellen, welche dann durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden können. Die Rückstände des Azellularisierungsdetergenz könnten die Rebesiedlung der Matrix mit den autologen Zellen behindern. Deshalb ist es notwendig, das Auswaschen bzw. die Abreicherung zu kontrollieren. Hierfür wird das Total Bile Acids Testkit der Firma Diazyme verwendet. Dies ist ein enzymbasierter Test, der auf der Messung von Thio-NADH beruht. Die Gallsäuren werden durch die 3- α Hydroxy-Steroid Dehydrogenase reversibel in 3-Keto-Steroid umgesetzt. Dabei wird Thio-NAD zu Thio-NADH reduziert. In der Rückreaktion reagiert das 3-Keto-Steroid zurück in die Gallsäure und NADH wird zu NAD. Die Menge an Thio-NADH, die in dieser Reaktion entsteht, ist proportional zum Gehalt an Gallsäuren in der eingesetzten Probe. Das entstandene Thio-NADH wird

photometrisch bei 405 nm vermessen. Die untersuchten Proben werden 1:10 mit UltraPure Wasser verdünnt und je 3 µl mit 200 ml Reagenz 1 aus dem Testkit vermengt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 42°C wird die Absorbtion bei 405 nm vermessen. Nach Zugabe von 70 µl Reagenz 2 erfolgt die Bestimmung der Absorbtion nach 0, 60, 120 und 180 Sekunden. Aus den ermittelten Werten kann, mit Hilfe der unten genannten Formel, der Gehalt an Gallsäuren berechnet werden. Hierfür wird ein Kalibrator aus dem Testkit mitgeführt.

$$\text{Konzentration Gallsäuren} = \frac{\Delta \text{Probe} - \Delta \text{Leerwert}}{\Delta \text{Kalibrator} - \Delta \text{Leerwert}} \times \text{Kalibrator}$$

Δ Probe = Emission nach 120 s- Emission nach 60s

Δ Kalibrator = Emission Kalibrator nach 120s – Emission Kalibrator nach 60s

Δ Leerwert = Emission Leerwert nach 120s – Emission Leerwert nach 60s

3.4.2.3 Bestimmung der funktionellen Stabilität

Die Vernährbarkeit eines Materials spielt für die Chirurgie und somit für den Einsatz am Patienten eine große Rolle. Zusätzlich ist das Material nach Implantation den ständigen Bewegungen des Patienten und eventuell einer künstlichen Beatmung ausgesetzt. Somit spielt hier die funktionelle Stabilität eine große Rolle. Im Zugversuch sind die Proben mit möglichst definierter Querschnittsfläche bis zum Reißen zu dehnen. Durch die Lagerung der BioVaSc könnte es zu Degeneration des Kollagengerüstes kommen, was die Reißfestigkeit beeinflussen könnte. Die Lagerstabilität und somit auch die Mindesthaltbarkeit werden über Zugversuche ermittelt. Hierfür wird die BioVaSc in 2 cm lange und 1 cm breite Streifen geschnitten, in einen Prüfstand der Firma Zwick eingespannt und stoßfrei, gleichmäßig und mit einer geringen Geschwindigkeit bis zum Reißen gedehnt. Die Kraft an der BioVaSc und die Längenänderung sind dabei kontinuierlich zu ermitteln (Abbildung 19).

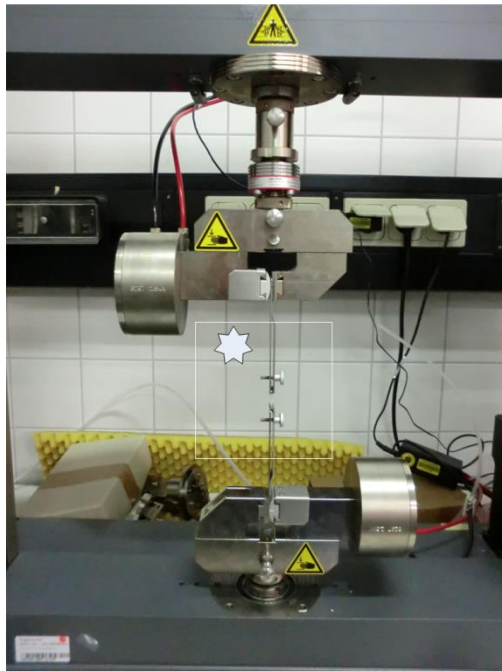


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Elastizitätsmessung am Prüfstand der Firma Zwick (1) Ein 2 cm langes Stück einer BioVaSc ist über zwei Halterungen mit dem Prüfstand befestigt

Mit Hilfe der zugehörigen Software wird die Zugspannung über die Dehnung aufgetragen und der Punkt der maximalen Spannung ermittelt.

3.4.2.4 DNS-Analysen der azellularisierten Matrix

Mit Hilfe einer runden Stanze werden Biopsien mit einem Durchmesser von 5 mm aus der BioVaSc sowie ein Gefäßpaar entnommen (Abbildung 20).

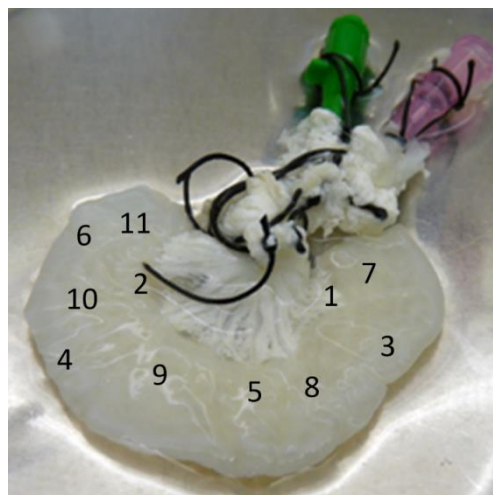


Abbildung 20: Entnahme Stellen für Biopsien zur DNA Analyse an einer BioVaSc.

Die Stellen werden dabei so gewählt, dass ein breites Spektrum der BioVaSc abgedeckt ist. Die Auflösung und Analyse der Matrix wird von der Firma Eurofins Medigenomix durchgeführt. Diese reinigt das Ausgangsmaterial mit der

säulenbasierten Extraktionsmethode von Macherey-Nagel Food Kit auf. Die Quantifizierung erfolgt dann über eine Real-Time-PCR Analyse. Die Proben von zwei Matrices wurden vor der Analyse bei -20°C und Vakuum über Nacht gefriergetrocknet.

3.4.3 Spezielle Nachweise für die Zellaktivität

Im Verlauf der Zellkultur kann es zum Verlust verschiedener Eigenschaften primärer Zellen kommen, da die Kulturbedingungen in vitro nicht ausreichen, um die Differenzierung der Zellen über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Außer den immunhistologischen Färbungen wurden weitere Verfahren zur Feststellung der Zelldifferenzierung und auch Zellvitalität etabliert.

3.4.3.1 Nachweis der Endothelzellaktivität mit fluoreszierendem LDL

Der Begriff low density Lipoprotein bezeichnet Vertreter einer von mehreren Klassen der Lipoproteine. Es dient als Transportvehikel für im Blutplasma zirkulierende, lipophile Substanzen wie beispielsweise Cholesterin oder fettlösliche Vitamine. LDL-Rezeptoren finden sich auf allen Zelltypen der Arterien und auf Hepatozyten. Die LDL-Partikel werden von diesen aufgenommen, fusionieren mit Lysosomen und werden schließlich abgebaut. Die Ausbildung dieses Rezeptors und die Aufnahme von LDL lassen sich durch Fluoreszenzmarkierung nachweisen. Dazu wird 1 µl des fluoreszenzgekoppelten LDL in 1 ml Endothelzellmedium gelöst und für 4 Stunden auf die Zellen gegeben. Danach werden die Schnitte unter dem Laser-Scanning Mikroskop betrachtet und fotografiert.

3.4.3.2 Lebend/Tot-Färbung

Für die Überprüfung der Zellvitalität nach der Besiedlung wird eine Lebend/Tot - Färbung durchgeführt. Hierzu wurde 4 µl Fluoresceindiacetat und 25 µl Propidiumjodid in 1 ml Basalmedium gegeben und für 7 Minuten inkubiert. Propidiumjodid wirkt hierbei als Nukleinsäureindikator und kann die intakte Zellmembran nicht durchdringen. Fluoresceindiacetat ist lipophil und kann somit die Zellmembran passieren. Im Zytoplasma wird es durch Esterasen gespalten und das polare, grün fluoreszierende Fluorescein entsteht. Bei intakter Zellmembran verbleibt dieses in der Zelle. Dadurch erscheinen lebende Zellen grün, während tote Zellen rot leuchten. Danach erfolgen ein Waschschrift mit PBS+ und die Analyse unter dem Laser-Scanning-Mikroskop.

3.4.3.3 Nachweis der Zellvitalität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

MTT wird in dieser Arbeit zum Nachweis der Zellvitalität in der Matrix verwendet. Das Prinzip beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Positive Zellen sind danach mikroskopisch in der Matrix erkennbar.

Für diesen Test wird das MTT-Reagenz mit einer Konzentration von 1 mg/ml im entsprechenden Medium gelöst und die besiedelte Matrix für 90 Minuten darin inkubiert. Danach wird diese für eine halbe Stunde mit PBS+ gewaschen und anschließend makroskopisch und mikroskopisch ausgewertet.

3.4.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie verwendet feingebündelte Elektronenstrahlen zur Untersuchung der Oberfläche. Dabei fokussieren Magnetspulen den Strahl auf dem zu untersuchenden Objekt. Trifft der Elektronenstrahl auf die Oberfläche, kommt es zu Wechselwirkungen mit der Selbigen, welche dann detektiert und in Grauwertinformationen umgewandelt werden. Der Elektronenstrahl wird über das Objekt geführt und dieses somit gerastert. Ein starkes Vakuum verhindert dabei Wechselwirkungen mit der Luft. Bei Experimenten von isolierenden Materialien kommt es stellenweise zur negativen Aufladung der Probe, wodurch eine Untersuchung unmöglich wird. In diesem Fall kann das zu untersuchende Objekt durch eine Besputterung mit Edelmetallen wie Gold oder Platin oder eine Bedampfung mit Graphit leitfähig gemacht werden. Das hier untersuchte Gewebe ist mit einer dünnen Goldschicht besputtert worden. Die Vergrößerung ergibt sich aus dem Verhältnis der abgerasterten Fläche und der Größe des Monitors. Theoretisch liegt diese bei 1 : 1 Million. Es werden je 3 µm dicke Schnitte eines autolog, besiedelten Implantats hergestellt und im Anschluss je 10 Minuten in Xylol, Roticlear sowie Isopropanol getaucht, um es zu entparaffinieren. Im Anschluss erfolgt die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung der Matrix

Die Matrix wurde, wie unter 3.1 beschrieben, in der experimentellen Medizin in Tübingen entnommen und in den GMP-Räumen des Fraunhofer IGB azellularisiert. In Abbildung 21 ist die Übersicht über die Prozessschritte der Azellularisierung dargestellt und im Folgenden weiter ausgeführt.

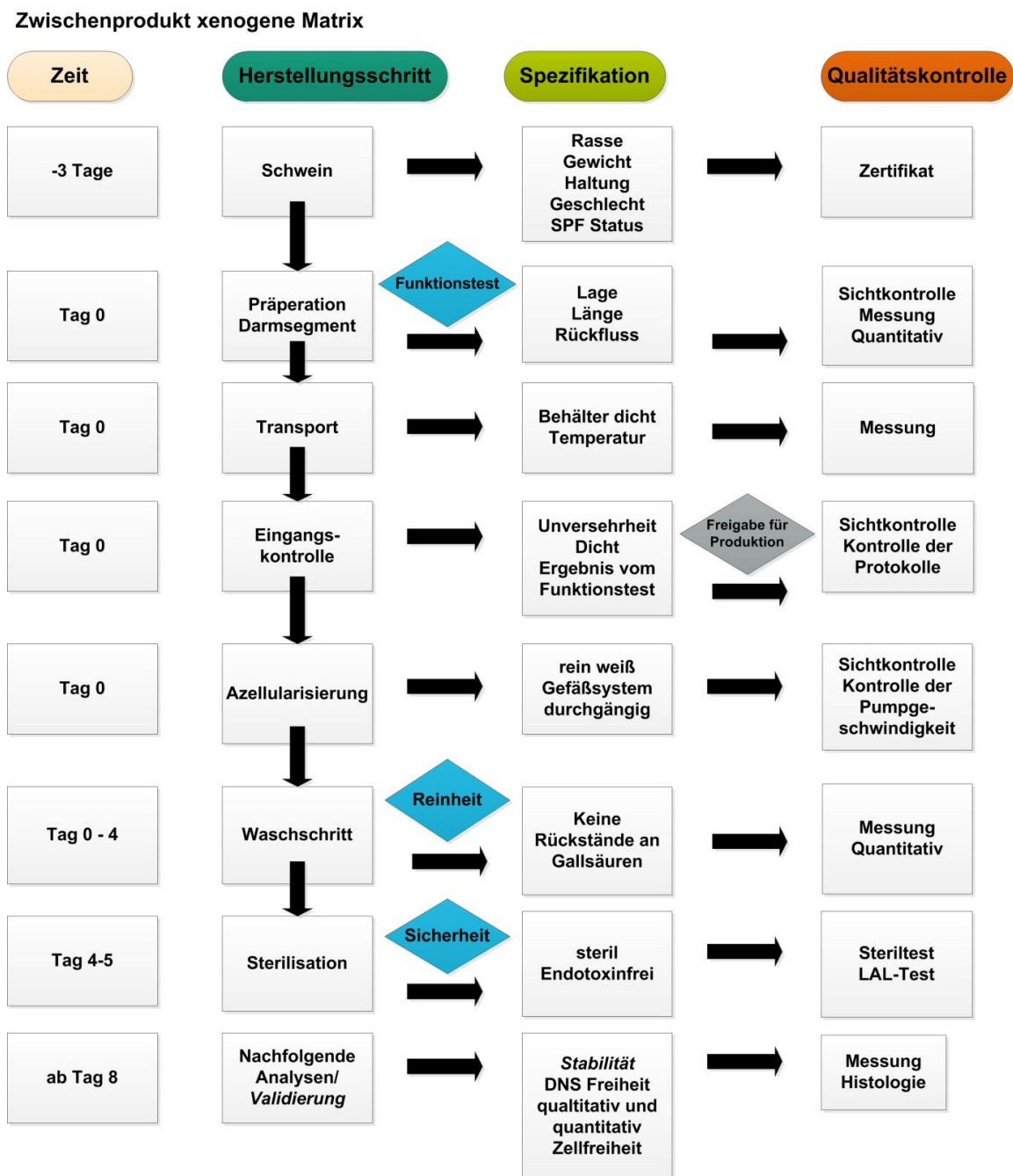


Abbildung 21: Prozessübersicht über die Azellularisierung

4.1.1 Entnahme der Dünndarmsegmente

Insgesamt wurden 85 Dünndarmsegmente präpariert und 70 davon azellularisiert. Segmente, die nicht angespült werden konnten oder Löcher aufwiesen, wurden nicht verwendet, da dadurch bedingt keine einwandfreie Azellularisierung möglich war.

4.1.2 Azellularisierung

Die Azellularisierung erfolgte wie unter 3.1.3 beschrieben. Hierzu wurde ein physiologischer Druckbereich von 80-100 mmHg gewählt, was 1 - 6 Pumpumdrehungen/min entsprach. Bei den Waschsritten sollte der Druck 120 mmHg nicht überschreiten, wobei der Durchschnitt bei 100 mmHg liegen sollte. Dies entsprach einem Anstieg der Pumpendrehzahl von 6 Umdrehungen/min am Ende der Azellularisierung auf bis zu 30 Umdrehungen/Minute nach den Waschsritten. Der Druckverlauf und die davon abhängige Pumpenleistung konnten damit ebenso wie die Entfärbung der Segmente als Inprozesskontrollen herangezogen werden.

4.2 Qualitätskontrolle der biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc)

Im Verlauf dieser Arbeit sind Protokolle zur Herstellung und Rebesiedlung einer biologisch, vaskularisierten Matrix (**B**iological **V**ascularized **S**caffold) unter den Regeln der guten Herstellungspraxis sowie entsprechenden Qualitätskontrollen etabliert worden. Die Azellularisierung wurde über 70 BioVaSc entwickelt und schrittweise an einen GMP Prozess adaptiert. Die Rebesiedlung der BioVaSc mit mikrovaskulären Endothelzellen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten wurde an 38 Matrices etabliert. Die restlichen azellularisierten Matrices fanden in der Entwicklung der Prüfmethode zur Qualitätskontrolle Verwendung.

4.2.1 Funktionsprüfung nach Entnahme

Als Akzeptanzkriterium für das Ausgangsmaterial ist das Ergebnis einer Funktionskontrolle bei Entnahme etabliert worden. Dieser Test diente zum Nachweis der Integrität und Unversehrtheit des Gefäßsystems als Voraussetzung für die Freigabe der Produktion (Eingangskontrolle). Hierzu wurde der venöse Rückfluss direkt nach der Präparation der Matrix bestimmt (Abschnitt 3.1.2) und die Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflussmessung

	perfundiertes Volumen [ml]	Rückfluss [ml]	Rückfluss [%]
Präparation mit dem Skalpell	15,8	1,9	12
	9,5	2,3	24
	7,1	4,1	58
	5,9	1,6	27
	14,5	9,8	68
	25,5	4,6	18
	18	5,7	31,7
	17,6	7,9	44,9
	16	6,7	41,9
Präparation mit dem Elektroskalpell	13,1	10,7	81,7
	14,3	10,2	71,3
	14,1	10,9	77,3

Die Messungen zeigen, dass es möglich ist, die Qualität der Präparation durch Rückflussmessungen zu bestimmen. Allerdings ist die Varianz zwischen den einzelnen BioVaSc sehr hoch und hängt sowohl von der Anatomie des Schweins als auch von der Güte der Präparation ab. Durch die Verwendung des Elektroskalpells, welches durchtrennte Gefäße verödet, konnte die Unversehrtheit des Gefäßsystems erhöht werden.

4.2.1.2 Prüfkriterien zur Eingangskontrolle

In Tabelle 7 sind die Prüfkriterien zur Eingangskontrolle zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Prüfkriterien bei der Eingangskontrolle

Parameter	Grenzwert
Zertifikate	√
Gefäßsystem anspülbar	√
Ohne Fäzesreste	√
<i>Transporttemperatur</i>	√
Optisch unversehrt	√
Venöser Rückfluss in %	> 50

4.2.2 Nachweis der Reinheit der BioVaSc

Der Nachweis der Reinheit der Matrix ist über den Gallsäuretest, histologische Analysen und den Nachweis der Endotoxine erfolgt.

4.2.2.1 Nachweis der Gallsäure

Zur Vermeidung von Immunreaktionen des Empfängers ist es notwendig, die implantierten, immunogenen Bestandteile der Matrix, wie beispielsweise Zellen oder deren Bestandteile, so gering wie möglich zu halten. Dies kann durch das Lysieren und anschließende Auswaschen der Zellfragmente erreicht werden. Für die Zellyse wurde das Natriumsalz der Desoxycholsäure, einer Gallensäure, verwendet (Abschnitt 3.1.3). Diese ist nach der Azellularisierung möglichst komplett aus der Matrix auszuwaschen, um einen negativen Effekt auf die zur Besiedlung vorgesehenen Patientenzellen bzw. den Patienten auszuschließen. Hierfür wurde PBS+ als Waschpuffer verwendet. Der Probenzug erfolgt zu den in Abschnitt 3.1.3 aufgelisteten Zeitpunkten. Für den Nachweis der Abreicherung wurde, für die Qualitätskontrolle, ein Test zum Nachweis der zurückgebliebenen Gallsäure etabliert (siehe Abschnitt 3.4.2.2). Die Ergebnisse sind exemplarisch für n = 10 Matrices in Abbildung 22 zu sehen.

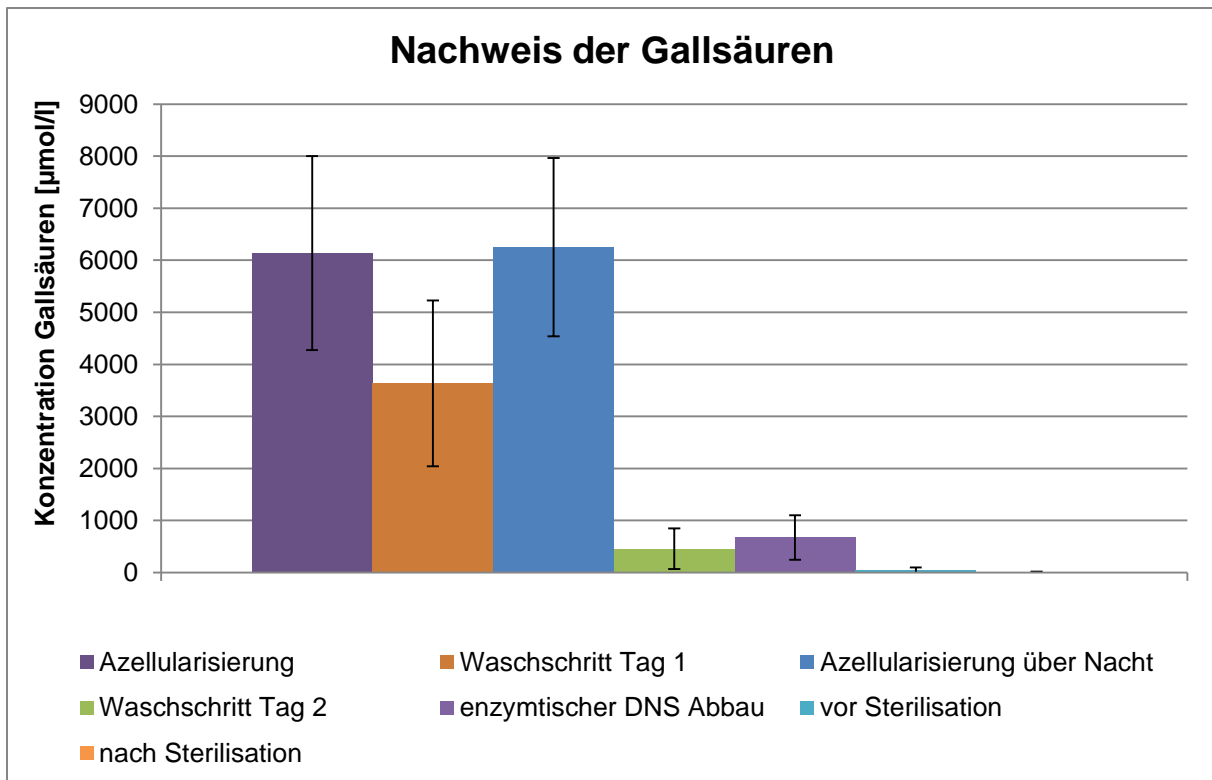


Abbildung 22: Das Diagramm zeigt das Auswaschen des zur Azellularisierung verwendeten Natriumdesoxycholats. Über die Dauer des Prozesses wird diese vollständig entfernt. (n=10)

Während der Azellularisierung mit Na-Desoxycholatlösung lässt sich der höchste Gehalt an Gallsäure nachweisen. Mit dem Entfernen der Zellreste durch Waschschriffe kommt es zum Absinken der Gallsäurekonzentration. Die weitere Azellularisierung über Nacht ist zum Lösen von festsitzenden Zellresten notwendig und führt zu einem Anstieg der Gallsäure auf die Ausgangskonzentration. Am nächsten Tag kann diese durch erneute Waschschriffe gesenkt werden. Während der enzymatischen Behandlung zur Degradation der enthaltenen DNS löst sich noch einmal Gallsäure aus der BioVaSc, welche dann zu einem Anstieg um 4% führen. Bis zur Sterilisation erfolgen noch weitere Waschschriffe, so dass vor der Sterilisation der Gallsäuregehalt schon auf 1% gesunken ist. Nach der Sterilisation ist die Konzentration an Gallsäure unter der Nachweisgrenze. In Tabelle 8 ist die Abreicherung des Natrium-Desoxycholats in Prozent dargestellt, wobei der erste Azellularisierungsschritt als 100% definiert wird.

Tabelle 8: Abreicherung der Gallsäure in Prozent

Azellularisierung	Waschschritt 2	enzymatischer DNS Abbau	vor Sterilisation	nach Sterilisation
100 %	7 %	11 %	1 %	Unter der Nachweisgrenze

Mit Hilfe des verwendeten Assays ist nach der Sterilisation eine Abreicherung der Gallsäure unterhalb der Nachweisgrenzen belegbar.

4.2.2.2 Nachweis der Reinheit über histologische Analysen und Bestimmung der Endotoxinwerte

Der Darm ist natürlicherweise mit einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Durch die Behandlung mit Natrium-Desoxycholat kommt es nicht nur zu einer Lyse der Darmzellen sondern auch der der Darmbakterien. Dies führt zu einer Freisetzung immunologischer Bestandteile wie beispielsweise Proteine, Lipide oder DNS. Besonders relevant sind hier die Endotoxine, dies sind Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien, welche im Empfänger des autologen Implantats starke Fieberschübe auslösen könnten. Zusätzlich aktivieren sie eine Reihe von Signalwegen in Immunzellen, was zu Entzündungsreaktionen führen kann. Der Nachweis der Endotoxine erfolgt extern, wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben, mit dem in der Pharmacopeia vorgeschriebenen LAL-Test. Die gesetzlich zulässige Grenze des Endotoxingehalts liegt bei $\leq 0,5$ EU/ml.

Da in der Matrix enthaltene porcine und bakterielle DNS zu Abstoßungsreaktionen im Empfänger führen könnten, ist es im Rahmen der Qualitätskontrolle notwendig, deren Gehalt zu bestimmen. Die Färbung nach Feulgen (Abschnitt 3.4.1.5) ist eine histochemische Methode zum qualitativen Nachweis von DNS. Hierbei wird zunächst die enthaltene DNS durch Salzsäure hydrolysiert, wodurch freie Aldehydgruppen entstehen. Diese ergeben mit fuchsinschwefliger Säure eine rosa Färbung und ermöglichen so die mikroskopische Auswertung.

Die Hämalaun/Eosin-Färbung (Abschnitt 3.4.1.2) dient zum Nachweis der noch vorhandenen porcinen Zellreste. Hierbei werden die Nuclei der Zellen blau dargestellt

wohin gegen die Matrix und das Zytoplasma sich rot färben. Die Färbungen sind für nativen Darm in Abbildung 23 dargestellt.

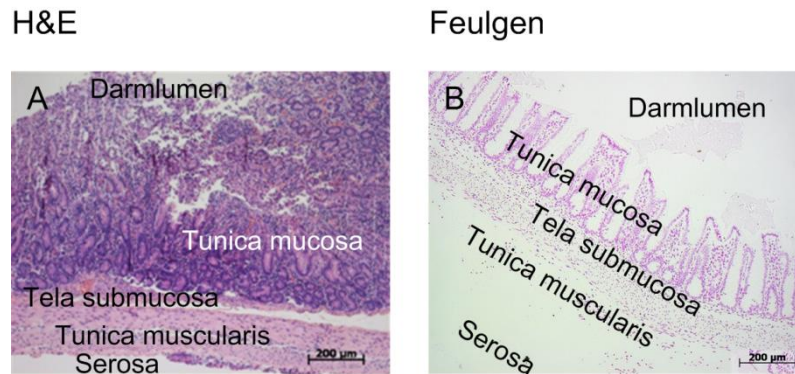


Abbildung 23: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte auf nativem Schweinedarm (A) H&E Färbung: die Zellen sind blau, die Matrix rot gefärbt; (B) Feulgen: die DNS stellt sich pink dar;

Im nativen Darm zeigen sich in der H&E-Färbung deutlich die Strukturen der Tunica mucosa mit dem dichten Bewuchs an Zellen. In der Tela submucosa und der Tunica muscularis sind die Zelldichten wesentlich geringer.

DNS zeigt sich in der Feulgen Färbung vorallem in der Tunica mucosa und der Tela submucosa. In der Tunica muscularis und der Serosa sind nur geringe Mengen an DNS angefärbt.

In Tabelle 9 ist eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Protokolle gegeben.

Tabelle 9: Übersicht über die einzelnen Protokolle

Protokoll	1	2	3	4
Endotoxine	nicht ermittelt	LAL-Test	LAL-Test	LAL-Test
Zellreste	H&E	H&E	H&E	H&E
DNS Reste	Feulgen	Feulgen	Feulgen	Feulgen
Qualität der Reagenzien	F&E	F&E	F&E	GMP
Nötige Änderungen	Bioreaktoren, veränderte Einwirkzeiten der Reagenzien	Antibiotika, Kühlung,	zertifizierte Reagenzien, Verzicht auf Antibiotika	

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse zu Protokoll 1 dargestellt.

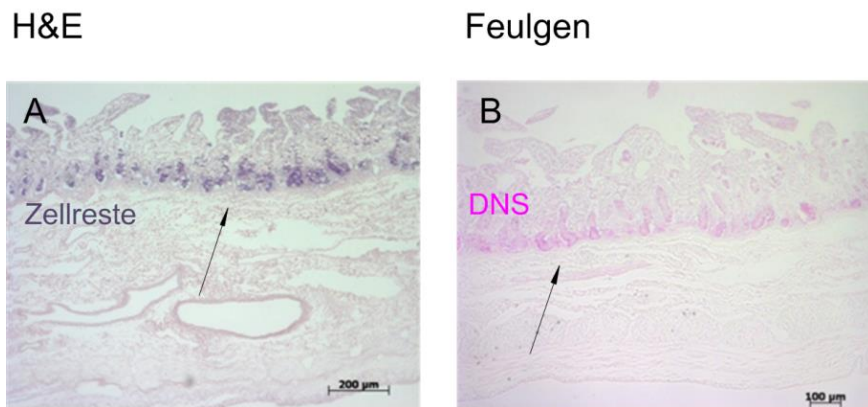
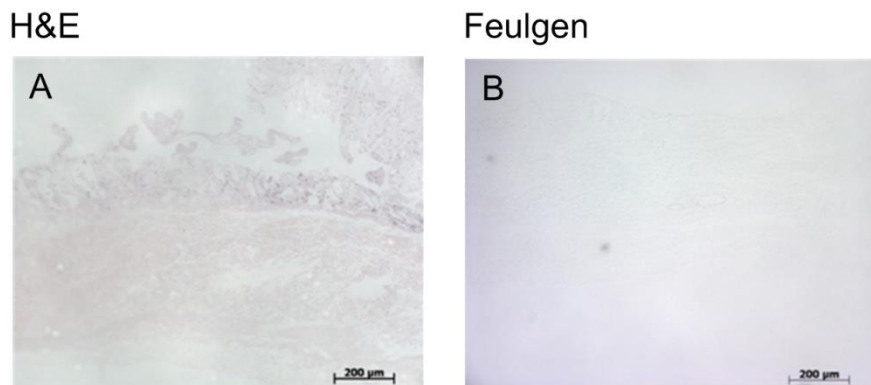


Abbildung 24: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem ersten Protokoll azellularisierten Matrices (A) H&E-Färbung: die Zellen sind blau, die Matrix rot gefärbt; (B) Feulgen: die DNS stellt sich pink dar. In der Tunica mucosa sind deutliche Zellreste erkennbar.

Nach dem ersten Azellularisierungsprotokoll verblieben noch Zell- und DNS-Reste im Bereich der ehemaligen Mucosastrukturen. Diese konnten durch die Optimierung des Protokolls mit beispielsweise veränderten Bioreaktoren und Einwirkzeiten eliminiert werden (Abbildung 25).



Endotoxin

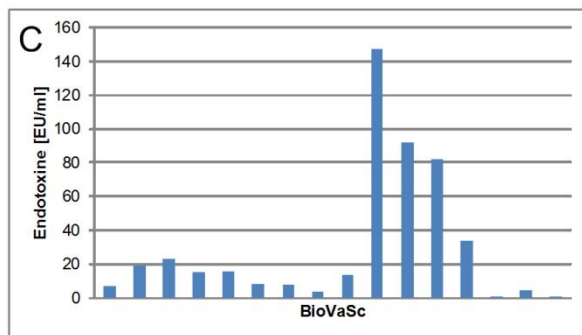


Abbildung 25: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem zweiten Protokoll azellularisierten Matrices (A) H&E-Färbung: die Zellen sind blau, die Matrix rot gefärbt; (B) Feulgen: die DNS stellt sich pink dar. Es sind keine DNS- und Zellreste nachweisbar. Die (C) Endotoxinwerte sind oberhalb der gesetzlichen Normen

Im zweiten Protokoll waren histologisch keine Zell- und DNS-Reste in der BioVaSc nachweisbar. Die Ergebnisse der Endotoxinmessungen waren mit durchschnittlich 31,5 EU/ml deutlich über den Vorgaben des Arzneimittelrechts ($\leq 0,5$ EU/ml). Somit konnte dieses Protokoll nicht weiter verwendet werden und wurde optimiert (Abbildung 26).

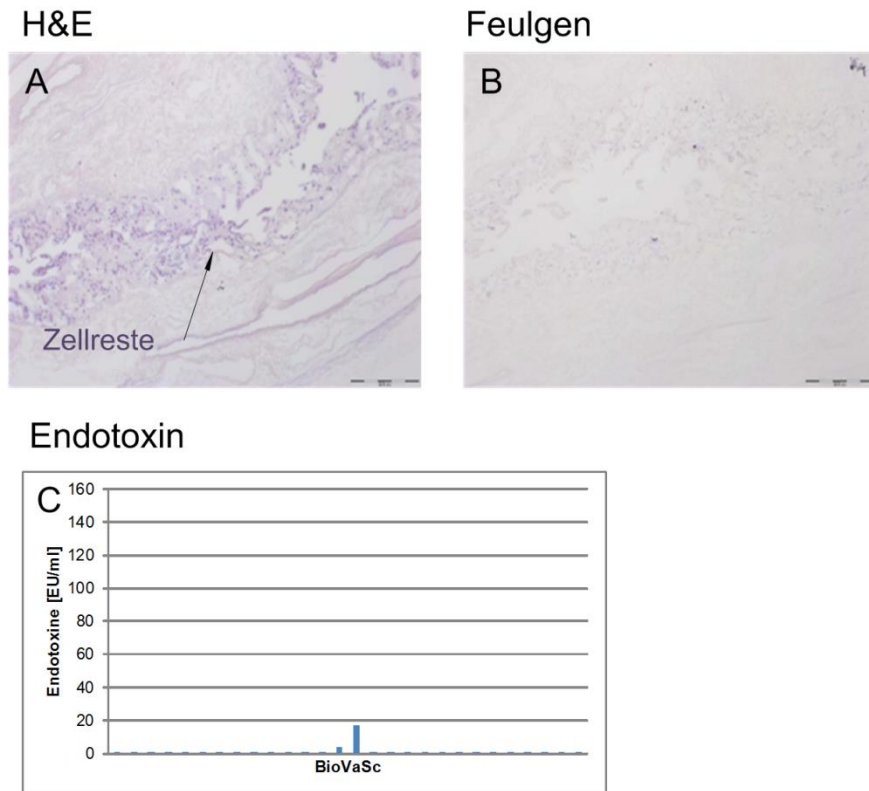


Abbildung 26: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem dritten Protokoll azellularisierten Matrices (A) H&E-Färbung: die Zellen sind blau, die Matrix rot gefärbt; (B) Feulgen: die DNS stellt sich pink dar. Es sind keine DNS- aber Zellreste in der Tunica mucosa nachweisbar. Die (C) Endotoxinwerte sind in der Regel innerhalb der gesetzlichen Normen

In der dritten Version des Azellularisierungsprotokolls wurden verschiedene Prozessschritte zur weiteren Optimierung etabliert. Zunächst ist die Matrix vor der Azellularisierung mit Natrium-Desoxycholat für eine Stunde im Bioreaktor gespült worden. Dies führte zu einer schlechteren Azellularisierung, da es durch das Vorspülen zu einem starken Ablösen der Zellen kam, dadurch erhöhte sich die Geschwindigkeit der Azellularisierung und somit verkürzte sich die Einwirkzeit des Natriumdesoxycholats. Dies zeigte sich in deutlichen Zellresten innerhalb der Matrix, auch wenn histologisch keine DNS nachweisbar war. Die Endotoxinwerte lagen durch den Einsatz von Gentamicin, Penicillin und Streptomycin in den

Waschschritten über Nacht innerhalb der gesetzlichen Normen. Aufgrund von anatomischen Besonderheiten wiesen zwei der Matrices längere Azellularisierungszeiten auf, was zu erhöhten Endotoxinwerten führte.

Da unter den Bedingungen des GMP möglichst auf Antibiotika verzichtet werden sollte, war der nächste Schritt die Kühlung der Lösungen zur Senkung der bakteriellen Wachstumsrate. Dabei sollte der eigentliche Azellularisierungsschritt bei Raumtemperatur stattfinden, da das Natriumdesoxycholat ansonsten eine gelartige Konsistenz annimmt und die Gefäße verstopft. Zusätzlich wurde das Protokoll stark verkürzt und somit kürzere Standzeiten bis zur Sterilisation erreicht. Des Weiteren ist das Enzym zur Degradation der DNS von DNase 1 auf die unter GMP-Bedingungen etablierte Benzonase umgestellt worden (Abbildung 27).

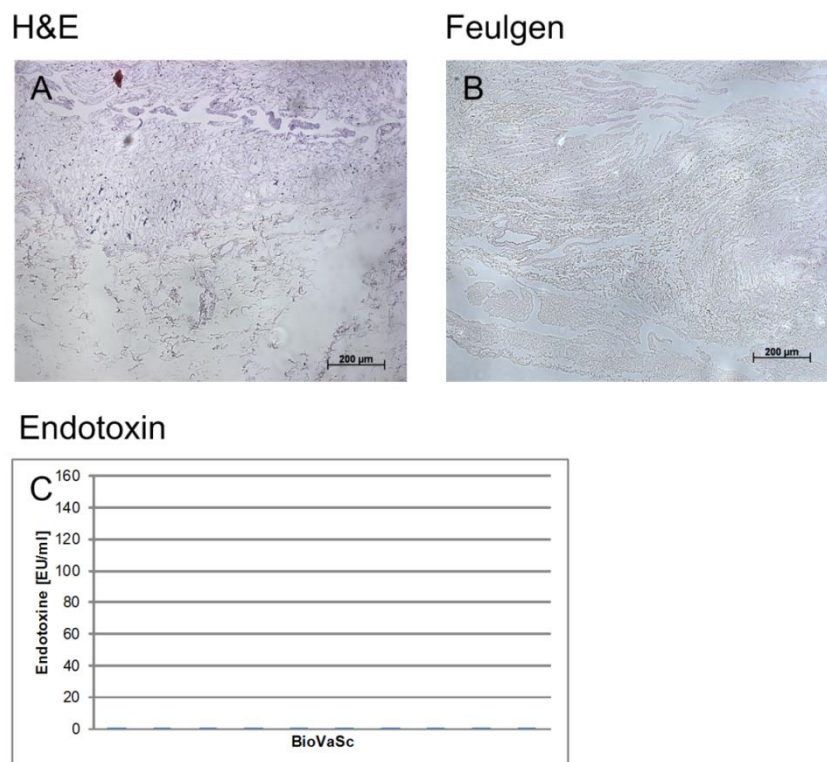


Abbildung 27: H&E und Feulgen gefärbte Paraffinschnitte nach dem vierten Protokoll azellularisierten Matrices (A) H&E-Färbung: die Zellen sind blau, die Matrix rot gefärbt; (B) Feulgen: die DNS stellt sich pink dar. Es sind keine DNS- und kaum Zellreste in der BioVaSc nachweisbar. Die (C) Endotoxinwerte sind innerhalb der gesetzlichen Normen

Nach Einführung der vierten Version des Protokolls zeigte sich noch ein geringer Anteil an Zellresten in der H&E-Färbung, während in der Feulgen Färbung keine DNS nachweisbar war. Die quantitative Analyse dazu ist in Abschnitt 4.2.2.3 gezeigt.

Die Endotoxinwerte sind ohne Antibiotika in den Prozessschritten innerhalb der zugelassenen Grenzwerte. Diese Protokollversion ist unter 3.1. beschrieben.

Zusammenfassung der entwickelten Protokolle

Anhand der Endotoxine, der Zell- und DNS-Reste sowie der Qualität der Reagenzien wurden die einzelnen Modifikationen der Azellularisierungsprotokolle beurteilt. (Tabelle 10)

Tabelle 10: Zusammenfassung der Azellularisierungsprotokolle

	1	2	3	4
Endotoxin	nicht ermittelt	>0,25 EU/U	<0,25 EU/U	<0,25 EU/U
Zellreste	positiv	negativ	positiv	negativ
DNS-Reste	positiv	negativ	positiv	negativ
Qualität der Reagenzien	F&E	F&E	F&E	GMP

Die Beurteilung der vier Kriterien ergab, dass nur nach Anwendung des unter Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Protokolls das Ergebnis den Anforderungen entsprach (Nummer 4).

4.2.2.3 DNS-Gehalt der Matrix

Zur quantitativen Bestimmung des DNS-Gehaltes wurden je sechs bis elf Stanzproben von drei Matrices, wie in Abschnitt 3.4.2.4 beschrieben, genommen, aufgelöst, die darin enthaltene DNS extrahiert und mittels RT-PCR quantifiziert (Abbildung 28).

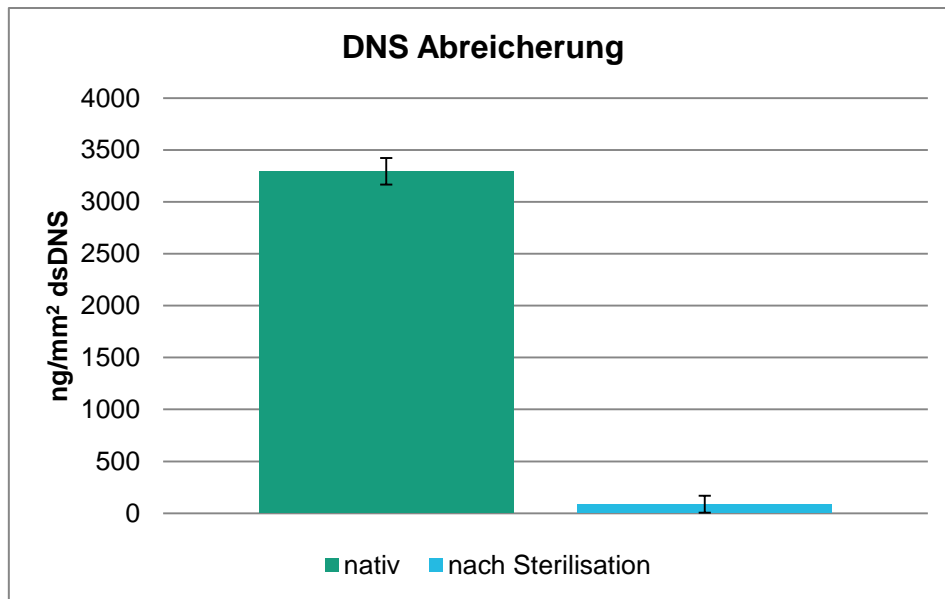


Abbildung 28: Mittelwert des DNS-Gehalts von 1 mm² Matrix an 6-11 verschiedenen Biopsiestellen von: nativem Darm und nach der Sterilisation. Dargestellt ist der Mittelwert aus 6-11 Stanzbiopsien. (n=3)

Im nativen Darm konnten im Mittelwert der Biopsieentnahmestellen 3293 ng DNS pro 1 mm² nachgewiesen werden. Durch die Azellularisierung und Verwendung von Benzoylperoxid zur DNS-Degeneration konnte der Gehalt auf 86 ng/ mm² gesenkt werden. Bei diesen Werten ist allerdings zu beachten, dass die Wiederfindungsrate der DNS bei der Säulenaufreinigung 25% beträgt.

In Tabelle 11 ist die Abreicherung der DNS in Prozent dargestellt, wobei die native Probe als 100% definiert wurde.

Tabelle 11: DNS-Gehalt der Matrix während der einzelnen Prozessschritte in Prozent

nativ	nach Bestrahlung
100 %	2,7 % SD +/- 2,6 %

Im Gesamten konnte durch das Azellularisierungsprotokoll die DNS-Menge um 97% gesenkt werden.

4.2.3 Identitätsprüfung der Matrix

Zur Charakterisierung der Matrix wurden verschiedene immunhistologische Färbungen durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Verwendet Antikörper zur Charakterisierung der BioVaSc

Kollagen 1 und 3	Wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix, wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und auch sezerniert, wichtig für die mechanische Festigkeit und Struktur eines Gewebes,
Fibronectin	Adhäsionsmolekül, bindet Zellen an Kollagen oder Proteoglycan, Integration in die extrazelluläre Matrix
Heperansulfatproteoglycan	Gruppe von komplexen Makromolekülen, vor allem in der Basalmembran und der extrazellulären Matrix exprimiert, kontrolliert die Zellproliferation und Differenzierung, wichtiger Bestandteil der Basalmembran, am Stoffaustausch und der Zellmigration beteiligt

In Abbildung 29 ist die immunhistologische Färbung mit den in Tabelle 12 gelisteten Antikörper gezeigt.

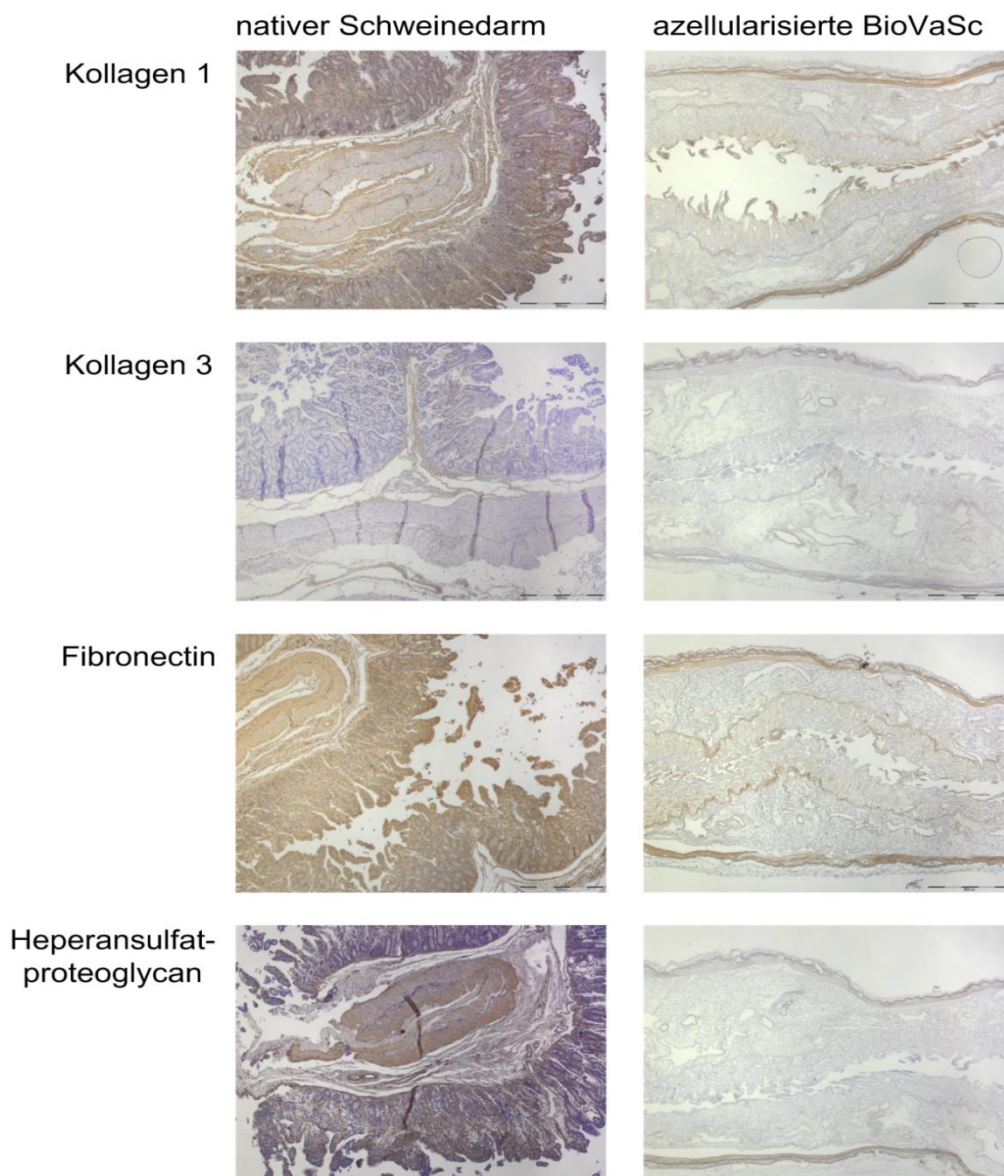


Abbildung 29: Immunhistologie zur Charakterisierung der azellularisierten BioVaSc im Vergleich zum nativen porcinen Darm.

Die Auswertung der Immunhistologie zeigte, dass Kollagen 1 sich im nativen Darm in allen Bereichen findet, wohingegen es durch die Azellularisierung reduziert wird und sich in Teilen der Mucosastrukturen und der ehemaligen Muskelschichten anfärben lässt. Kollagen 3 findet sich im nativen Darm im Bereich der Tela Submucosa und der Muskelschichten. In der azellularisierten BioVaSc ist es noch im Bereich der Tela Submucosa nachweisbar. Fibronectin ist im nativen Darm Bestandteil aller Schichten und findet sich in der BioVaSc vor allem im Bereich der Submucosa sowie der ehemaligen Muskelschichten. Heparansulfatproteoglycan ist im nativen Darm im Bereich der Mucosa und der Muskelschichten anfärbar. Nach der Azellularisierung ist es vor allem in den ehemaligen Muskelschichten nachweisbar.

4.2.4 Funktionelle Stabilität der Matrix

Eine mechanische Stabilität ist bei chirurgischer Implantation unerlässlich, da es durch die Bewegungen des Patienten sowie einer eventuellen künstlichen Beatmung zu Belastung des Implantats kommt. Zusätzlich ist es für die Qualitätsicherung eines ATMPs notwendig die maximalen Lagerzeiten beziehungsweise ein Mindesthaltbarkeitsdatum festzulegen. Eine Lagerung der Matrix könnte zur Degeneration der enthaltenen Bestandteile der extrazellulären Matrix führen. Zur Untersuchung der funktionellen Stabilität ist die Reißfestigkeit von verschiedenen BioVaSc ermittelt worden. Hierbei wurden die BioVaSc bei 4°C (n=16), bei 42°C (n= 9) und bei 60°C (n=3) gelagert und untersucht. Hierfür sind diese in einen Prüfstand der Firma Zwick eingespannt und stoß frei, gleichmäßig und mit einer geringen Geschwindigkeit bis zum Reißen gedehnt worden (Abschnitt 3.4.2.3). Hieraus wurde die maximale Zugspannung ermittelt und in Abbildung 30 dargestellt.

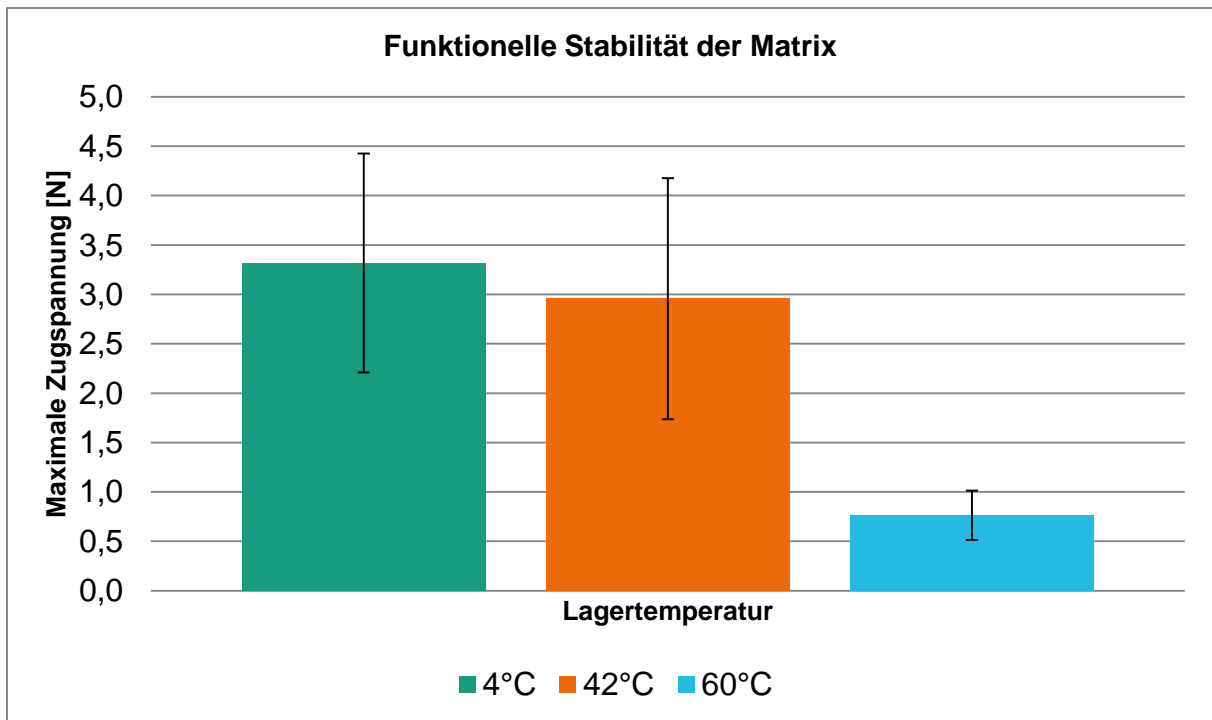


Abbildung 30: Zur Ermittlung der funktionellen Stabilität der Matrix ist die maximale Zugspannung (N) bei verschiedenen Lagertemperaturen [°C] ermittelt und grafisch dargestellt worden. 4°C n=16, 42°C n=9, 60°C n=3

Die bei 4°C gemessenen Proben waren zwischen 24 und 253 Tagen gelagert, bevor sie analysiert wurden. Dabei ergab sich im Mittel ein Wert von 3,32 N bevor die Matrix riss. Die bei 42°C gelagerten Proben waren 60 Tage alt und hatten im Mittel eine maximale Zugspannung von 2,96 N. Bei 60°C wurden die Proben für 1,5 Tage aufbewahrt und rissen danach im Schnitt bei 0,76 N. Über die verschiedenen Lagertemperaturen konnte also ein Abfall der Stabilität des Kollagens um 2,56 N beobachtet werden.

4.3 Herstellung der primären Zellkulturen

Im Verlaufe dieser Arbeit sind die Protokolle zur Isolation von adulten mikrovaskulären Endothelzellen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten unter GMP-Bedingungen weiter entwickelt bzw. etabliert worden. Die einzelnen Prozessschritte sind in Abbildung 31 dargestellt und werden im Folgenden näher erläutert.

Zwischenprodukt autologe Zellen

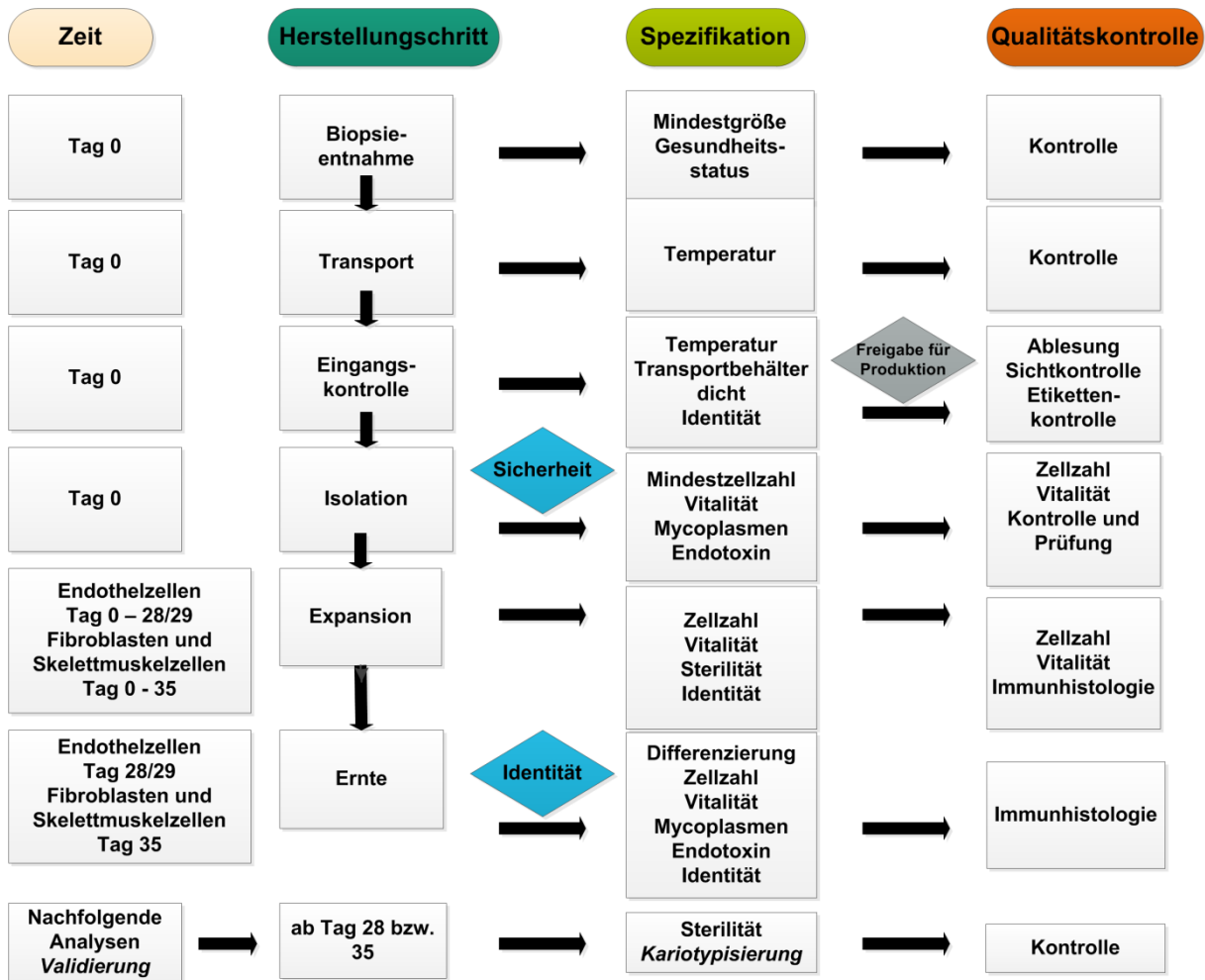


Abbildung 31: Prozessschema zur Herstellung und Kultivierung der Zellkulturen

4.3.1 Isolation der Zellen aus Biopsien

Die Zellen sind aus adulter Haut oder Skelettmuskelbiopsien, wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, isoliert worden. Insgesamt ließen sich 50 Endothelzell-, 30 Skelettmuskel- und 23 Fibroblastenisolationen durchführen.

4.3.2 Expansion der Zellen

Die mikrovaskulären Endothelzellen sind durchschnittlich auf 33 Millionen Zellen expandiert worden. Von den Fibroblasten und Muskelzellen war eine Gesamtzellzahl von 10 Millionen ausreichend.

4.4. Identitätskontrolle der Zellen

Der Identitätsnachweis der Zellen spielt in der Qualitätskontrolle eine wichtige Rolle. Hierfür wurden immunhistologische Färbungen etabliert und die Veränderungen der Zellen über die Dauer der Kultur kontrolliert.

Für die Besiedlung der BioVaSc werden mikrovaskuläre Endothelzellen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten aus Biopsiematerial isoliert und im Labor vermehrt. Für die spätere Implantation ist es notwendig, die Identität der amplifizierten Zellen nachzuweisen. Zusätzlich sorgen das zur Subkultivierung benötigte Enzym und der dadurch für die Zellen entstehende Selektionsdruck für Veränderungen innerhalb des Zellstoffwechsels und somit zu einem veränderten Proteinexpressionsmuster. Die Identität der Zellen ist über die Expression zelltypischer Marker in immunohistochemische Färbungen nachgewiesen worden. Hierzu wurden zelltypspezifische Antikörperfärbungen an in ChamberFlask kultivierten Zellen durchgeführt und diese bis zur 4 Passage ausgewertet. (Abschnitt 4.4.1.4).

In Tabelle 13 sind die verwendeten Antikörper zur Färbung der Fibroblasten gelistet.

Tabelle 13: Zur Färbung von Fibroblasten verwendete Antikörper

Antigen	Beschreibung
Desmin	zum Zyotskelett gehörendes Typ-3 Intermediärfilament; hauptsächlich in der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur vorhanden; es verbindet die Myofibrillen der quergestreiften Muskulatur zu Bündeln bzw. die Z-Scheiben der Muskelfasern.
Proly-4-hydroxylase (Fibroblast)	Enzymkomplex der die Hydroxylierung von Prolyresten katalysiert. Er ist essentiell für die Kollagensynthese. Er kommt in Fibroblasten und weiteren Zelltypen vor, wird allerdings nicht von allen Körperzellen exprimiert.
Myogenin	Transkriptionsfaktor für die Aktivierung von muskelspezifischen Gene, im adulten Organismus vor allem bei der Regeneration von Skelettmuskel exprimiert.
Myosin	Familie von Motorproteinen, an der Umwandlung von chemischer Energie in Kraft und Bewegung beteiligt, eine weitere Funktion ist zusammen mit beispielsweise Dynein oder Kinesin der intrazelluläre Transport, zusätzlich ist es an der Zellbewegung und Adhäsion beteiligt.
Kollagen Typ 1	Wird von spezialisierten Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten synthetisiert, fibrilläres Kollagen des Bindegewebe kommt vor allem in Haut und Knochen vor.
MyoD	Myogener Faktor 3, Transkriptionsfaktor, am Aufbau des Skelettmuskels beteiligt, löst die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen aus.
Vimentin	Typ 3- Intermediärfilament des Zytoskeletts, es kommt im Zytoplasma (teilweise im Nucleolus) von Zellen mesenchymaler Herkunft vor, somit beispielsweise in Fibroblasten, Endothel- und Muskelzellen, über die genaue Funktion ist wenig bekannt, wird in diesem Fall als positive Kontrolle verwendet.

In Abbildung 32 ist die immunhistochemische Färbung auf vier Passagen der isolierten Fibroblasten gezeigt. Hierfür wurden die in Tabelle 13 beschriebenen Marker verwendet.

	Desmin				Fibroblast				Myogenin				Myosin			
	% positiv				% positiv				% positiv				% positiv			
Passage	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Mittelwert	1	1	8	1	36	56	21	34	0	0	0	---	4	0	0	0
Standardabweichung	2	1	11	2	36	52	30	46	0	0	---	---	8	0	0	0
Anzahl	9	6	2	4	9	7	2	4	3	3	1	0	9	7	2	4

	Kollagen I				MyoD				Vimentin			
	% positiv				% positiv				% positiv			
Passage	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Mittelwert	79	82	33	72	0	0	0	---	87	100	100	100
Standardabweichung	27	37	47	48	0	0	---	---	29	0	0	0
Anzahl	9	7	2	4	3	3	1	0	9	7	2	4

Abbildung 32: Immunhistologische Analyse auf vier Passagen Fibroblasten gegen die in Tabelle 13 gelisteten Antikörper.

Die eher für Muskelzellen typischen Marker Desmin, Myogenin, Myosin und MyoD wurden auf ihre Expression in Fibroblasten-Kulturen getestet. Sie ist bei diesen Markern in allen vier Passagen eher gering. Der Fibroblasten Marker ist gegen die Prolyl-4-hydroxylase gerichtet und soll diese spezifisch anfärben. Die höchste Expression zeigt sich in der zweiten Passage bei 56% der Zellen, in allen andern Passagen schwankt der Wert zwischen 21 - 36% der Zellkultur. Kollagen 1 kann in Passage 1 ,2 und 4 zu 72 - 79% angefärbt werden. In Passage 3 kommt es scheinbar zu einem Einbruch, welcher aber durch die Anzahl der Färbungen beeinflusst sein kann. Vimentin dient als positive Kontrolle der Färbung und sollte von 80-100% der Zellen exprimiert werden.

Die Ergebnisse für die Färbung der Endothelzellen sind im Folgenden dargestellt. Tabelle 14 zeigt die hierfür verwendeten Marker.

Tabelle 14: Für die Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen verwendete Antikörper

Antigen	Beschreibung
CD31/ PECAM 1	Transmembranöses Glycoprotein mit einer Molekularenmasse von 130 kDa, gehört zur Familie der Immunglobuline und wird von Endothelzellen und einigen Leukozyten exprimiert, Adhäsionsprotein mit homogener und heterophiler Bindungsstelle, wobei die homogene die transendotheliale Diapedese und der Passage durch extrazelluläre Membran von Leukozyten dient, die heterogenen enthalten Intigrine $\alpha v\beta 3$ und Glykosaminoglykane.
vWF	von-Willebrand-Faktor, Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII, wird vor allem von Endothelzellen aber auch von Megakaryozyten gebildet, außerdem befindet er sich in den α -Granula der Thrombozyten, wird das Endothel verletzt und die Gefäßwand freigelegt bindet der vWF an die Oberfläche und sorgt für die Bindung von Thrombozyten und ist somit an der extrinsischen Blutgerinnungskaskade beteiligt.
Prolyl-4-hydroxylase (Fibroblast)	Enzymkomplex der die Hydroxylierung von Prolyresten katalysiert. Er ist essentiell für die Kollagensynthese. Er kommt in Fibroblasten und weiteren Zelltypen vor, wird allerdings nicht von allen Körperzellen exprimiert.
Vimentin	Typ 3- Intermediärfilament des Zytoskeletts, es kommt im Zytoplasma (teilweise im Nucleolus) von Zellen mesenchymaler Herkunft vor, somit beispielsweise in Fibroblasten, Endothel- und Muskelzellen, über die genaue Funktion ist wenig bekannt, wird in diesem Fall als positive Kontrolle verwendet.

In Abbildung 33 ist die immunhistologische Färbung über vier Passagen der isolierten mikrovaskulären Endothelzellen dargestellt. Hierfür wurden die in Tabelle 14 beschriebenen Marker verwendet.

	CD 31				von Willebrand				Fibroblast				Vimentin			
	% positiv				% positiv				% positiv				% positiv			
Passage	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Mittelwert	89	98	98	99	40	37	52	41	20	7	12	15	99	99	98	100
Standardabweichung	25	5	2	1	42	38	45	46	42	22	34	38	2	2	2	1
Anzahl	12	10	8	7	12	10	8	7	10	10	8	7	12	10	8	7

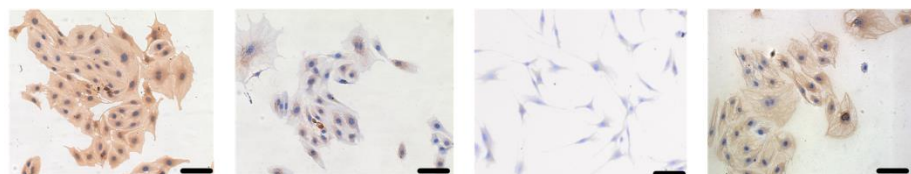


Abbildung 33: Immunhistologische Färbung gegen die Marker CD31 und vWF auf vier Passagen mikrovaskuläre Endothelzellen mit den in Tabelle 14 gelisteten Antikörpern

CD31 wird in allen vier Passagen von 89 - 99% der mikrovaskulären Endothelzellen gebildet. Der von Willebrand-Faktor wird spenderabhängig sehr unterschiedlich exprimiert und zeigt im Mittelwert in der dritten Passage mit 52% die höchste und in der zweiten Passage mit 37 % den niedrigsten Wert an positiv gefärbten Zellen.

Anhand der hohen Standardabweichung wird deutlich, dass die Expression zwischen einzelnen Spendern zwischen 0 – 100% aller Zellen schwankt. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten oder der Körperregion der entnommenen Biopsie gezogen werden. Der Fibroblasten-Marker dient zur Überprüfung der Reinheit der mikrovaskulären Endothelzellkultur. Hierbei war es möglich, einen Teil der Fibroblasten in den Kulturen anzufärben und somit Rückschlüsse auf die Reinheit der Kultur zu ziehen. Vimentin dient als positive Kontrolle und muss von minimal 80% der Zellen exprimiert werden.

Zusätzlich wurde exemplarisch, wie in Abschnitt 3.4.3.1 beschrieben, in der dritten Passage bei 5 Isolationen die Aufnahme von markiertem LDL getestet (Abbildung 34).

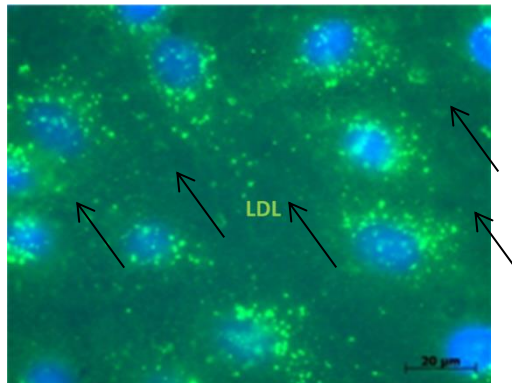


Abbildung 34: Aufnahme von Fluoreszenz markiertem LDL in mikrovaskulären Endothelzellen. Das in Vesikeln eingeschlossene LDL leuchtet grün. Der Zellkern ist mit DAPI gegengefärbt und erscheint blau. n=5

Es zeigte sich, dass das gelabelte LDL von den mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen wird und im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden kann.

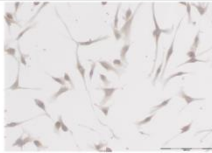
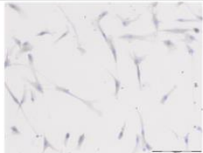
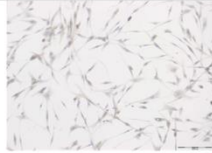
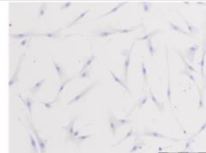
Die Ergebnisse für die Skelettmuskelisolation sind im Folgenden dargestellt. Tabelle 15 zeigt die hierfür verwendeten Marker.

Tabelle 15: Zur Charakterisierung der Skelettmuskelzellen verwendete Antikörper

Antigen	Beschreibung
Desmin	Zum Zyotskelett gehörendes Typ-3 Intermediärfilament; hauptsächlich in der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur vorhanden; es verbindet die Myofibrillen der quergestreiften Muskulatur zu Bündeln bzw. die Z-Scheiben der Muskelfasern.
Fibroblast (Prolyl-4-hydroxylase)	Enzymkomplex der die Hydroxylierung von Prolyresten katalysiert. Er ist essentiell für die Kollagensynthese. Er kommt in Fibroblasten und weiteren Zelltypen vor, wird allerdings nicht von allen Körperzellen exprimiert.
Myogenin	Transkriptionsfaktor in Wirbeltieren, tritt besonders in der Regenerationsphase von Skelettmuskelzellen auf.
Myosin	Familie von Motorproteinen, an der Umwandlung von chemischer Energie in Kraft und Bewegung beteiligt, eine weitere Funktion ist zusammen mit beispielsweise Dynein oder Kinesin der intrazelluläre Transport, zusätzlich ist es an der Zellbewegung und Adhäsion beteiligt.
Kollagen 1	Wird von spezialisierten Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten synthetisiert, fibrilläres Kollagen des Bindegewebe kommt vor allem in Haut und Knochen vor.
MyoD	Myogener Faktor 3, Transkriptionsfaktor, am Aufbau des Skelettmuskels beteiligt, löst die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen aus.
Vimentin	Typ 3- Intermediärfilament des Zytoskeletts, es kommt im Zytoplasma (teilweise im Nucleolus) von Zellen mesenchymaler Herkunft vor, somit beispielsweise in Fibroblasten, Endothel- und Muskelzellen, über die genaue Funktion ist wenig bekannt, wird in diesem Fall als positive Kontrolle verwendet.

In Abbildung 35 wird die immunhistologische Färbung auf vier Passagen der isolierten Skelettmuskelzellen gezeigt. Hierfür wurden die in Tabelle 15 beschriebenen Marker verwendet.

	Desmin				Fibroblast				Myogenin				Myosin			
	% positiv				% positiv				% positiv				% positiv			
Passage	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Mittelwert	29	43	40	35	30	53	57	20	5	38	57	9	11	11	9	5
Standardabweichung	23	35	35	34	47	48	49	34	11	47	48	16	22	16	20	13
Anzahl	13	16	10	7	13	15	10	7	12	16	10	7	12	16	10	7

	Kollagen 1				MyoD				Vimentin			
	% positiv				% positiv				% positiv			
Passage	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Mittelwert	44	100	99	37	0	36	40	22	89	98	87	100
Standardabweichung	53	1	3	47	0	50	49	40	29	7	32	0
Anzahl	7	8	5	5	7	11	7	7	12	16	10	7

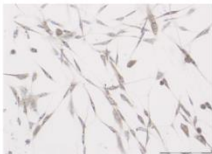
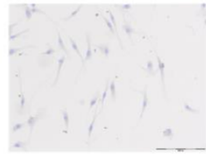
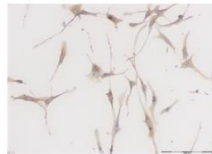




Abbildung 35: Charakterisierung von Skelettmuskelzellen mit den in Tabelle 15 gelisteten Markern

Bei der Isolation von Muskelzellen wird die Struktur des Muskels zerstört. Bei den isolierten Zellen handelt es sich um sogenannte Satellitenzellen, über die sich der Muskel *in vivo* regeneriert und die sich nach und nach differenzieren. Der Marker Desmin wird in der ersten Passage von im Durchschnitt 29% der Zellen exprimiert und steigert sich in der zweiten Passage auf 43% der Zellen. Über Passage drei und vier scheint es dann über 40% und 35% der Zellen wieder zu einem Absinken zu kommen. Der eigentlich für die Färbung von Fibroblasten gedachte Marker Prolyl-4-hydroxylase, wird in den Skelettmuskelkulturen in einem ähnlichen Maße exprimiert wie in den Fibroblastenkulturen und kann somit nicht zur Unterscheidung herangezogen werden. Myogenin steigert sich bis Passage drei von 5% über 38% auf 57 % der Zellkultur. In Passage vier sind dann noch 9% der Zellkultur positiv für Myogenin. Myosin wird in Passage 1 und 2 von 11% der Zellen exprimiert und sinkt dann über 9% auf 5% der Zellen in Passage 4 ab. Die Expression von Kollagen 1 ist im Vergleich zu den Fibroblastenkulturen erhöht. In Passage 2 und 3 sind 100% bzw. 99% der Zellen positiv für Kollagen 1 gefärbt und können somit nicht zur Unterscheidung der Zelltypen dienen. MyoD steigert sich bis zur dritten Passage auf

40% der Zellkultur und fällt danach auf 22% ab. Vimentin dient als positive Kontrolle und sollte von 80-100% der Zellen exprimiert werden.

Da die Muskelzellen und Fibroblasten, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, zusammen in das Lumen der BioVaSc gesiedelt werden, ist eine Unterscheidung nach erfolgter Kultur wünschenswert, um das Wachstumsverhalten der einzelnen Zelltypen zu analysieren. Hierfür wäre ein Marker notwendig, welcher alle Zellen des einen und gleichzeitig keine des anderen Zelltypen anfärbt. Der Vergleich der immunhistologischen Färbung der Skelettmuskelzellen und der Fibroblasten ist in Tabelle 16 gezeigt.

Tabelle 16: Vergleich der Antikörperexpression von Fibroblasten und Skelettmuskelzellen + circa 1/3 aller Zellen gefärbt ++ circa die Hälfte bis 2/3 aller Zellen gefärbt +++ über 90% aller Zellen gefärbt

Antikörper gegen	Desmin	Myogenin	Myosin	MyoD	Prolyl-4-hydroxylase/ Fibroblast	Kollagen 1	Vimentin
Skelettmuskelzellen	+	+	-	+	+	++	+++
Fibroblasten	-	-	-	-	+	++	+++

Die typischen Muskelmarker Desmin, Myogenin, Myosin und MyoD wurden von den Fibroblasten nicht und von den Muskelzellen nur teilweise exprimiert. Sie eignen sich also nicht zur Unterscheidung der Zelltypen. Die Prolyl-4-hydroxylase, Kollagen 1 und Vimentin sind von beiden Zelltypen in einem ähnlichen Maße gebildet worden und können somit auch nicht zur Unterscheidung herangezogen werden.

4.5 Herstellung des autologen Implantats

Insgesamt sind 30 azellularisierte BioVaSc mit humanen Endothelzellen rebesiedelt und kultiviert worden, um eine möglichst geschlossenes Gefäßsystem zu erreichen

(Abschnitt 3.3.1.1). Des Weiteren sind im Anschluss 13 Reaktoren zusätzlich mit Fibroblasten und Muskelzellen besiedelt (Abschnitt 3.3.1.2) worden, um die Wechselwirkungen der Ko-Kultur zu untersuchen. Zusätzlich sind drei Versuche mit humanen mesenchymalen Stammzellen und drei Matrices mit upcyte mvEC der Firma Medicyte, wie Abschnitt 3.2.1.5 beschrieben, durchgeführt worden. Das Prozessschema ist in Abbildung 36 gezeigt und im weiteren Verlauf genauer erläutert.

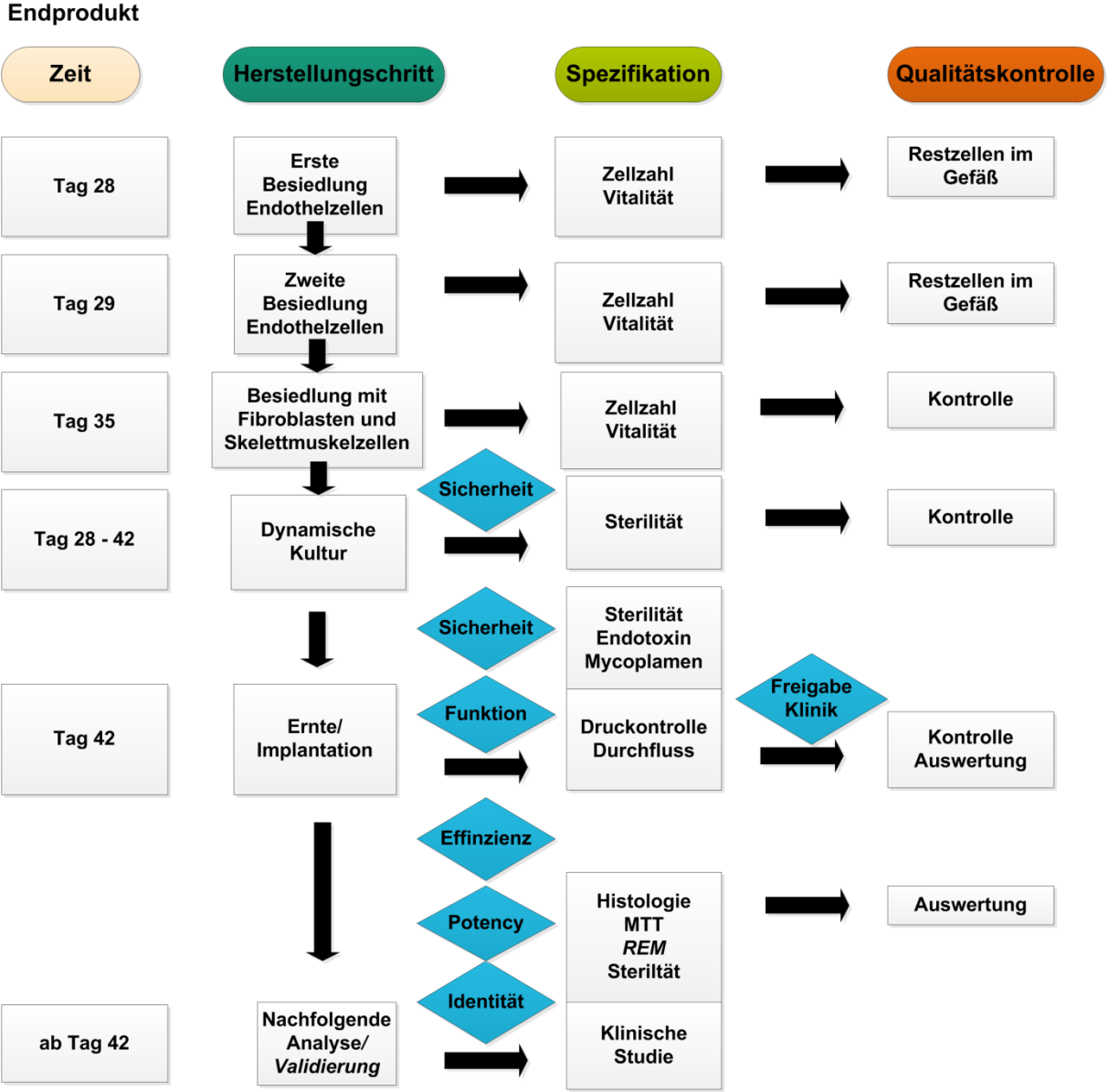


Abbildung 36: Prozessschema zur Besiedlung und Kultur der BioVaSc mit primären Zellen

4.5.1 Effizienz der Beladung der Kapillarstrukturen

Die Kapillarstrukturen sollten möglichst vollständig besiedelt werden. Dabei kam es bei den einzelnen Besiedlungsverfahren zu unterschiedlich starken Zellverlusten. Zur Bestimmung wurden die Zellen, welche nach der Besiedlung nicht in der BioVaSc verblieben waren gezählt und als prozentualer Anteil zur Gesamtzellzahl analysiert. (Abbildung 37). Dabei ergeben sich die Daten von der Besiedlung mit einer Spritze aus 9 Reaktoren, bei der Umstellung und der Besiedlung des Infusomators sind vier Reaktoren ausgewertet worden.

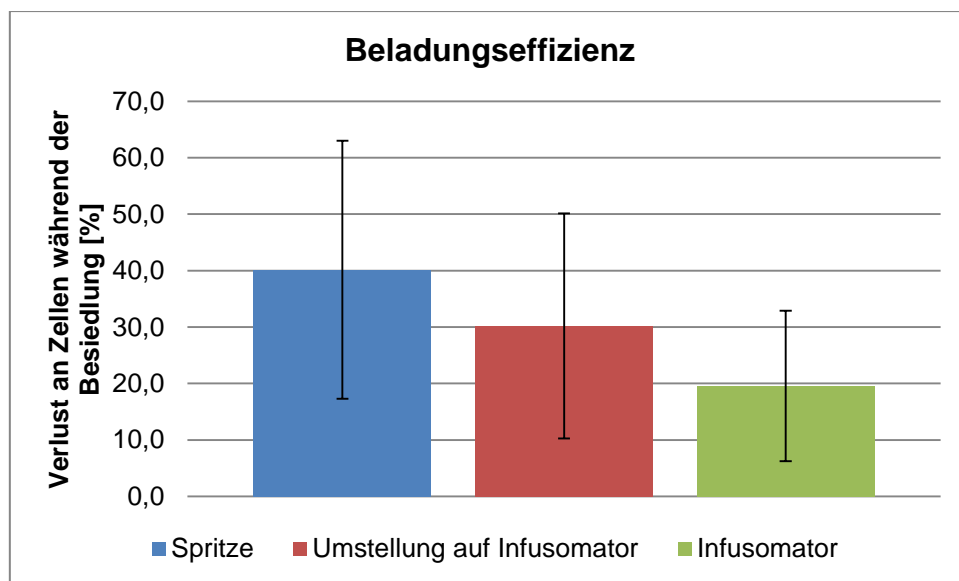


Abbildung 37: Steigerung der Beladungseffizienz durch Umstellen von der Spritze (n=9) auf den Infusomotor (n=4) und Anpassen des Protokolls (n=4).

Die zunächst verwendete Methode mit einer Spritze führte zu einer hohen Anzahl ausgeschwemmter Zellen. Mit einer Verringerung des Volumens konnte eine Verbesserung erreicht werden, allerdings war das Ergebnis nicht befriedigend. Zusätzlich ist der auf den Spritzenkolben ausgeübte Druck stark von der durchführenden Person abhängig und nur schwerlich standardisierbar. Deshalb wurde die Besiedlung auf die Verwendung eines Infusomators umgestellt. Durch den definierbaren Volumenstrom konnte die Durchflussrate vereinheitlicht werden und ist somit unabhängig von der durchführenden Person. Durch Anpassen des Protokolls konnte die Anzahl der in der BioVaSc verbleibenden mikrovaskulären Endothelzellen weiter erhöht werden.

4.5.2 Besiedlung des Lumens des autologen Transplantats

Das Lumen der BioVaSc wurde, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, besiedelt. Durch das Drehen nach drei Stunden sollte sichergestellt werden, dass beide Seiten des Lumens besiedelt worden sind, wobei stellenweise eine Hälfte aufgrund der Schwerkraft bevorzugt wurde.

4.6 Kultur des autologen Transplantats und technische Voraussetzungen

Zu den technischen Voraussetzungen für die Herstellung eines autologen Transplantats gehört der im Folgenden beschriebene Bioreaktor und der zugehörige Inkubatorwagen. Durch die Kombination aus beiden soll die Nährstoffversorgung sowie der Abtransport der Stoffwechselendprodukte sichergestellt und kontrollierte sowie körpernahe Bedingungen hergestellt werden, um ideale Bedingungen für die Reifung des Gewebekonstrukts sicherzustellen.

4.6.1 Bioreaktorsysteme und Inkubatorwagen

Am Fraunhofer IGB wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Uniklinikum Würzburg ein Bioreaktorsystem mit zugehörigem Inkubatorwagen entwickelt. Dieses ermöglicht kontrollierte Bedingungen für die Kultur und Reifung des autologen Implantats. Die mikrovaskulären Endothelzellen werden unter einem konstanten Fluidstrom und dem damit zugehörigen Scherstress möglichst körpernah kultiviert, während die Skelettmuskelzellen und Fibroblasten ohne mechanische Belastung bleiben. Der Inkubatorwagen sorgt währenddessen für die richtige Umgebungstemperatur und den benötigten Kohlenstoffdioxidgehalt. Zusätzlich reguliert er die Pumpe und sorgt so für den benötigten Fluidstrom.

4.6.1.1 Bioreaktor zur Kultivierung der BioVaSc

Der Bioreaktor ermöglicht die physiologische Perfusion der BioVaSc (Abbildung 38).

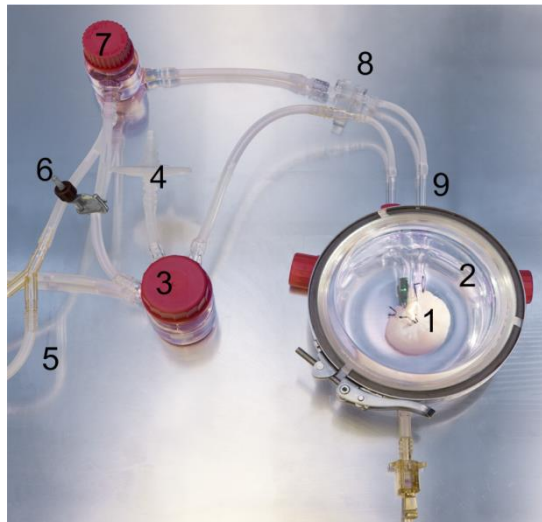


Abbildung 38: Bioreaktorsystem zur Kultivierung der autolog besiedelten Implantats (1) BioVaSc (2) Bioreaktorkammer (3) Vorratsflasche (4) Luftfilter (5) Zugang zur Pumpe (6) Klemme zur Steuerung des Fluidstroms (7) Flasche zur Druckregulation (8) Dome für Drucksensor (9) arterieller Zugang in die BioVaSc

Zur Kultur befindet sich die autolog besiedelte BioVaSc in einem Glasreaktor und wird über den arteriellen Zugang mit dem Kreislaufsystem verbunden. In diesem Reaktor sammelt sich das Zellkulturmedium und fließt beim Erreichen des Abflusstutzens in eine Vorratsflasche mit Luftfilter, welcher den Gasaustausch im System ermöglicht. Von dort gelangt das Medium über die pulsatile, perfundierende Pumpe in die Flasche zur Druckregulation. Diese enthält ein Luftpolster, dessen Größe über die Verbindung zur Volumenflasche bzw. die darin enthaltene Klemme reguliert werden kann und somit die Einstellung der Amplitude der Druckkurve erlaubt. Von dort aus gelangt das Medium über den Druckdome in den arteriellen Zugang der BioVaSc. Zu Beginn wird der Mittelwert über einen Zeitraum von zehn Stunden von 10 mmHg auf 100 mmHg gesteigert, um die Zellen an die Bedingungen zu gewöhnen und sie nicht während der Phase des Adhärenzens auszuspülen. Die Amplitude beträgt hierbei zwischen +/-10 bis 20 mmHg. Die Kultur findet dann schließlich bei einem Mittelwert von 100 mmHg mit einer Amplitudenhöhe von +/- 20 mmHg statt und entspricht so dem physiologischen Blutdruck. Der so erzeugte Fluidstrom bietet den mikrovaskulären Endothelzellen körpernahe Bedingungen und stimuliert sie dadurch, ihre Differenzierung beizubehalten.

4.6.1.2 Bioreaktoren unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis

Für den Einsatz in der guten Herstellungspraxis (GMP) sollten die Bioreaktoren in der Handhabung vereinfacht werden. Dazu wurde ein Bioreaktor aus

Polyetheretherketon (PEEK) entwickelt, welcher mit der Hilfe einer CNC-Fräse hergestellt wird. Dabei steht CNC (computerized numerical control) für eine Maschinensteuerung über eingebaute Computer. Sie ermöglicht das 3D-Fräsen und so die Erzeugung komplizierter 3D-Konstrukte. Hierbei wird das Werkstück über viele, eng beieinanderliegende Zeilen abgefahren und Stück für Stück abgefräst. So entsteht ein Reaktor aus einem Werkstück mit sicherem Stand und standardisierten Schlauchlängen. Die Möglichkeiten der Druckregulation bleiben dabei erhalten. Hierfür wurde eine CAD-Zeichnung und eine Simulation erstellt, aus welcher schließlich der Prototyp gefertigt wurde (Abbildung 39).

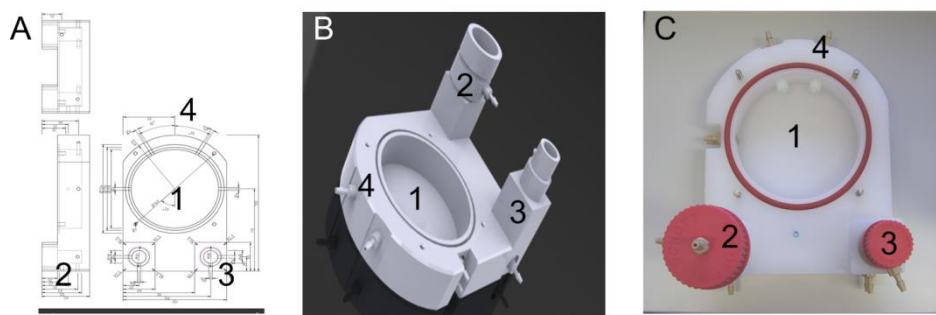


Abbildung 39: Bioreaktoren für die gute Herstellungspraxis (A) CAD-Zeichnung (B) Simulation (C) gefertigter Prototyp (1) Bioreaktorkammer (2) Vorratsflasche mit Adapter für den Luftfilter (3) Flasche zur Druckregulation (4) arterieller Zugang

Der Prototyp hat in drei Testläufen Verwendung gefunden und sich als grundlegend geeignet erwiesen. Das Ziel ist nun die Weiterentwicklung zu einem aus Polystyrol gefertigten Spritzgussteil. Bei diesem soll möglichst vollständig auf Schläuche verzichtet werden und vorgefertigte Kanäle die einzelnen Flaschen mit der Bioreaktorkammer verbinden. Somit wäre eine Herstellung als Einzelstück finanzierbar und die Frage der Reinigungsvalidierung gelöst. Diese ist in Bezug auf die Prionenübertragung bei mehrfacher Nutzung des Materials bei verschiedenen Patienten zu beachten. Dabei stellen alle Ecken und scharfen Kanten ein Problem dar, welches durch die Verwendung von Einwegmaterial gelöst wird.

4.6.2 Inkubatorwagen

Im Laufe dieser Arbeit sind zwei Reaktorwagen entwickelt und weiter an die Bedingungen der guten Herstellungspraxis angepasst worden. Die Entwicklung dieser Inkubatorwagen war notwendig, weil in standardisierten Brutschränken die nötige Technik wie beispielsweise die zum Erzeugen des Fluidstroms notwendigen Pumpen, nicht untergebracht werden kann. Zusätzlich ist eine genaue

Dokumentation der Verläufe von Druck, Kohlenstoffdioxid Konzentration und der Temperatur zur Sicherung der Patientendaten notwendig. Dies ist in einem Standardinkubator nicht durchführbar.

4.6.2.1 1 Version des Inkubatorwagens

Parallel zu den Bioreaktoren ist ein erster Inkubatorwagen für die Bedingungen der GMP entwickelt worden. Dieser bietet die Möglichkeit, zwei Bioreaktoren parallel zu kultivieren. Die Temperatur, der Fluidstrom und der Gasgehalt werden von zwei unabhängig voneinander arbeitenden μ -Kontrollern reguliert und die entsprechenden Daten aufgezeichnet und dargestellt (Abbildung 40).

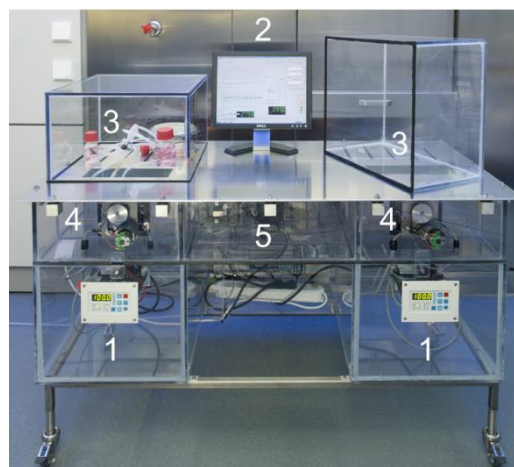


Abbildung 40: Inkubatorwagen (1) Steuerungseinheit/ μ -Kontroller (2) Ausgabegerät (3) Inkubator-kammer (4) Pumpen (5) Heizung

Der Zusammenhang der einzelnen Komponenten ist in Abbildung 41 dargestellt. Der Kontroller bekommt über den am Druckdome befestigten Sensor eine Rückmeldung über den Istwert und gleicht die Daten mit dem zu erreichenden Sollwert ab. Über den Kontroller wird dann die Pumpe angesteuert, welche dafür sorgt, dass das Zellkulturmedium mit physiologischem Druck durch das Gefäßsystem der Matrix gepumpt wird. Durch den erzeugten Fluidstrom soll eine ideale Versorgung der Zellen, bei gleichzeitigem Abtransport von Stoffwechselprodukten und physiologische Belastung der Zelle, erfolgen. Außerdem reguliert der Wagen die Temperatur auf 37°C und den Kohlenstoffdioxidgehalt auf 5%. Die Darstellung der Daten erfolgt dann auf einem externen Display (Abbildung 41).

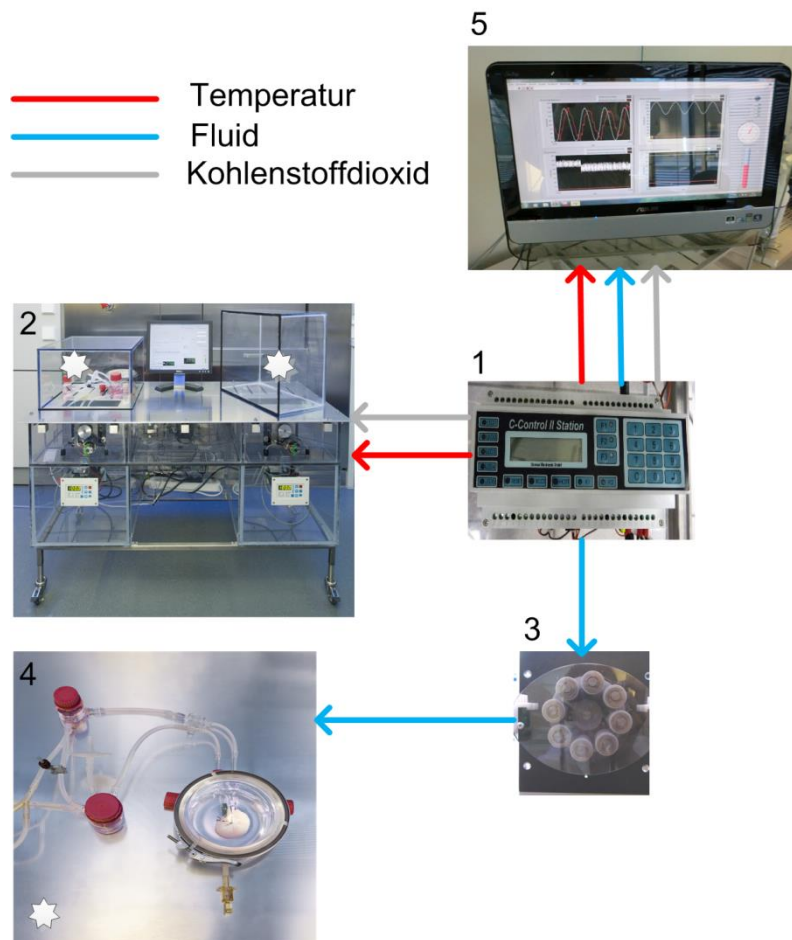


Abbildung 41: Schematischer Aufbau des verwendeten Bioreaktorsystems und Darstellung der entsprechenden Regelung. (1) Kontroller (2) Inkubatorwagen (3) Pumpe (4) Bioreaktor (5) Darstellung und Aufzeichnung der Daten

Der Inkubatorwagen muss, aufgrund der geplanten Verwendung in einem GMP-Prozess in Reinraumklasse B verschiedene Eigenschaften wie beispielsweise die Gewährleistung der vollständigen Oberflächen Desinfektion mit Reinraum üblichen Mitteln, zwei getrennt steuerbare Bioreaktorkammern zur Erhöhung der Patientensicherheit, eine stabile Regelung des Kohlenstoffdioxid-Gehalts und der Temperatur bis hin zur vollständigen Dokumentation aller relevanten Daten, erfüllen. Der entwickelte Inkubatorwagen wurde hinsichtlich seiner CO₂-Regeneration und der Regelung der Kammertemperatur einer prä-Validierung unterzogen (Abbildung 42). Dabei wurde für die Temperatur ein Grenzwert von 36,5 -37,5°C und für das CO₂ von 4,7 - 5.2% festgelegt.

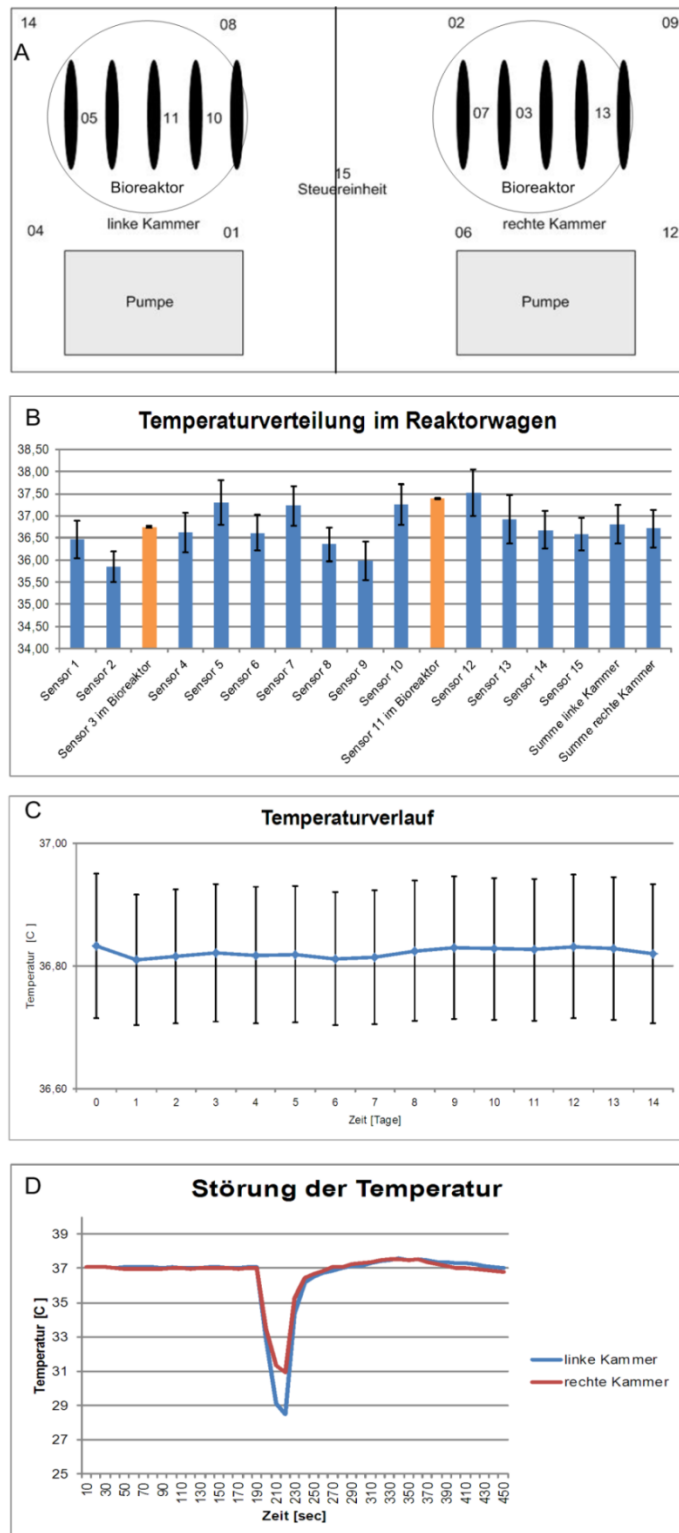


Abbildung 42: (A) Messpunkte zur Dokumentation der Temperatur innerhalb der Inkubator kammer; (B) Darstellung der gemessenen Temperaturen im Zeitverlauf ohne Kammeröffnung über 14 Tage; (C) Temperaturverlauf über 14 Tage; (D) benötigte Erholzeit zur Temperaturregulation nach Öffnen der Kammer. Typische Verläufe mit n=1

Die Temperatur wurde durch 15 Messsonden an unterschiedlichen Punkten innerhalb des Inkubatorwagens aufgenommen. Zwei dieser Sonden befanden sich direkt in den Bioreaktoren. Innerhalb der Kammer schwankte die Temperatur

zwischen 35,5 und 37,5 °C. Die durchschnittliche Temperatur in den Bioreaktoren sank nie unter 36,5°C und stieg nicht über 37,4°C an, was für die Zellkultur humaner Zellen ideale Bedingungen darstellt. Der Temperaturverlauf über 14 Tage verlief stabil zwischen 36,7 bis 36,9 °C. Eine eingebrachte Störung durch das Öffnen der Kammer und somit dem Einströmen von auf 21°C temperierter Raumluft wurde binnen 1 Minute auf 36,5°C reguliert.

Die Erholzeiten des CO₂ nach Öffnen der Kammer sind in Abbildung 43 für n=3 gezeigt.

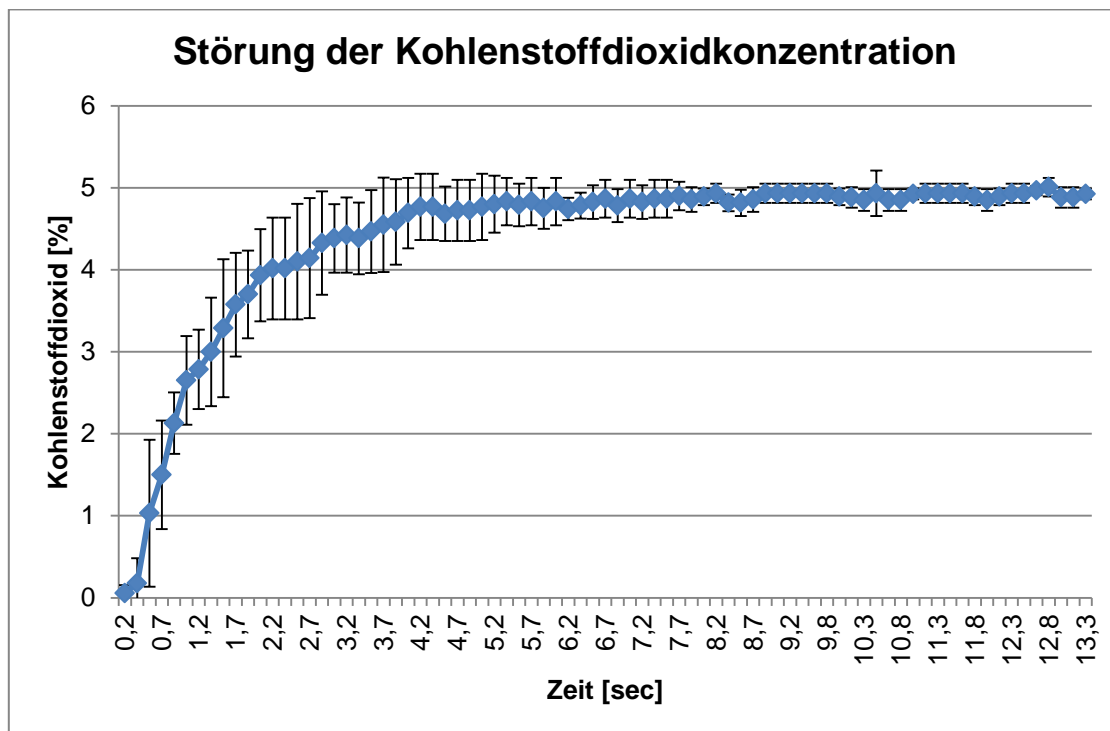


Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der Erholzeiten des CO₂-Gehalts in der Kammerluft nach ein minütiger Öffnung. Nach 12-13 Minuten war der CO₂ Gehalt wieder auf 5% reguliert.

Es kommt für circa 3 Minuten zu einem verstärkten Einstrom des CO₂. Ab dann ist die Einstellung feiner, somit strömt weniger Gas ein und ein Überschießen wird vermieden. Nach 13 - 14 Minuten ist der CO₂-Gehalt in der Luft des Reaktorwagens wieder bei 5%.

In Abbildung 44 ist der Verlauf der Drücke über 14 Tage dargestellt.

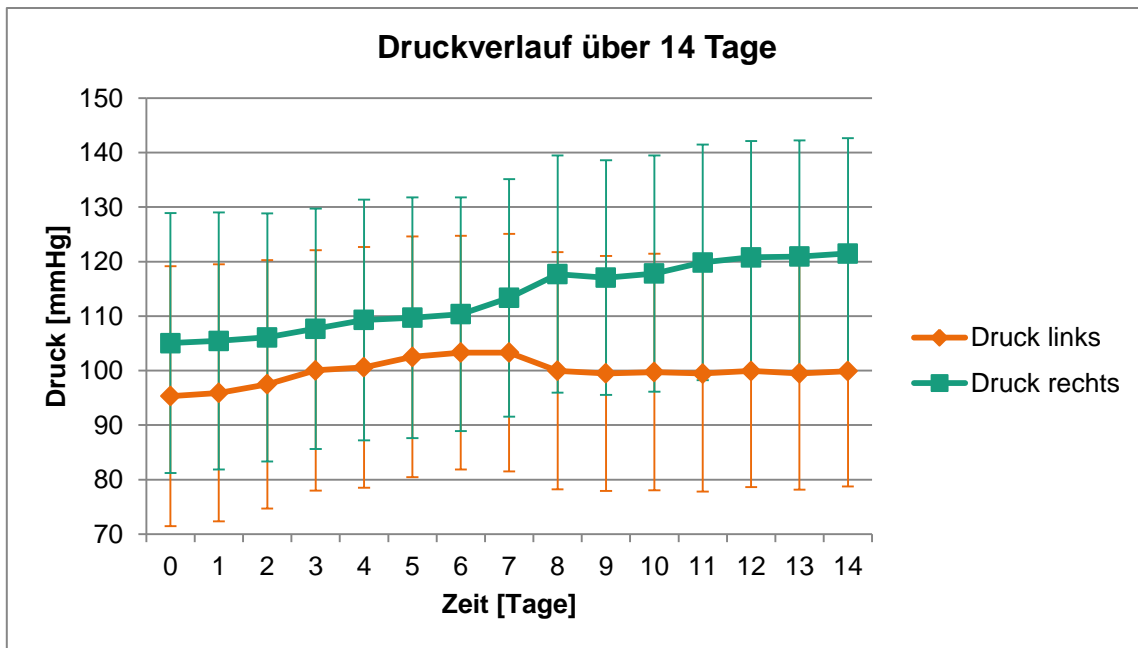


Abbildung 44: Druckverlauf von zwei Reaktoren über 14 Tage. In grün ist die rechte Kammer und in orange die linke Kammer dargestellt. Die einzelnen Messerwerte der Tage wurden jeweils gemittelt.

Der Druckbereich sollte idealerweise bei 80-120 mmHg liegen. Allerdings sind die Zellen im Körper beispielsweise bei Belastung auch Druckschwankungen ausgesetzt. Die hier ermittelten Werte von 72 - 144 mmHg sind im physiologischen Rahmen und für die Kultur geeignet. Im Mittelwert über den Tag übersteigt der Druck 125 mmHg bei den Messungen nicht und fällt nicht unter 98 mmHg. Die Schwankungen zwischen den beiden Reaktoren sind vermutlich durch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Zellen entstanden oder liegen in der Anatomie der BioVaSc begründet.

4.6.2.2 Zweite Version des Inkubatorwagens

Der zweite Inkubatorwagen sollte für die Bedingungen der guten Herstellungspraxis in Bezug auf die Reinigung bzw. Desinfektion optimiert werden. Hierzu gehören beispielsweise die Vermeidung von Ecken, Rillen und Kanten sowie die Verwendung zertifizierter und desinfizierbarer Oberflächen. Auch die Partikelemission muss bei der Verwendung in Reinräumen beachtet werden. Aufgrund dieser Anforderungen wurde der Inkubatorwagen weiterentwickelt (Abbildung 45).



Abbildung 45: Inkubatorwagen für die gute Herstellungspraxis (1) Steuerungseinheit/Kontroller (2) Ausgabegerät (3) Inkubatorkammer (4) Pumpen (5) Heizung

Der Inkubatorwagen verfügt über zwei getrennt steuerbare Pumpen und bietet so die Möglichkeit, zwei Transplantate parallel herzustellen. Die verwendeten Materialien sind so weit wie möglich Reinraum zertifiziert und leicht desinfizierbar. Die Steuerung erfolgt wie im vorher etablierten Inkubatorwagen. (Abschnitt 4.6.2.1)

4.7 Qualitätskontrolle des autologen Implantats

Nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktorsystem wird diese beendet und die Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe von MTT (Abschnitt 3.4.3.3), immunhistologischen Färbungen (Abschnitt 3.4.1.3) und REM-Aufnahmen (Abschnitt 3.4.3.4) erstellt.

4.7.1 Nachweis der Besiedlung und der Zellvitalität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

Als schneller qualitativer Nachweis über die Zellvitalität und Verteilung innerhalb der Matrix wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) verwendet. Lebende Zellen sind in der Lage das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in blauviolett Formazan umzuwandeln. Dieses bildet nadelförmige Kristalle innerhalb der Zelle, welche makroskopisch oder mikroskopisch detektiert werden können (Abbildung 46).

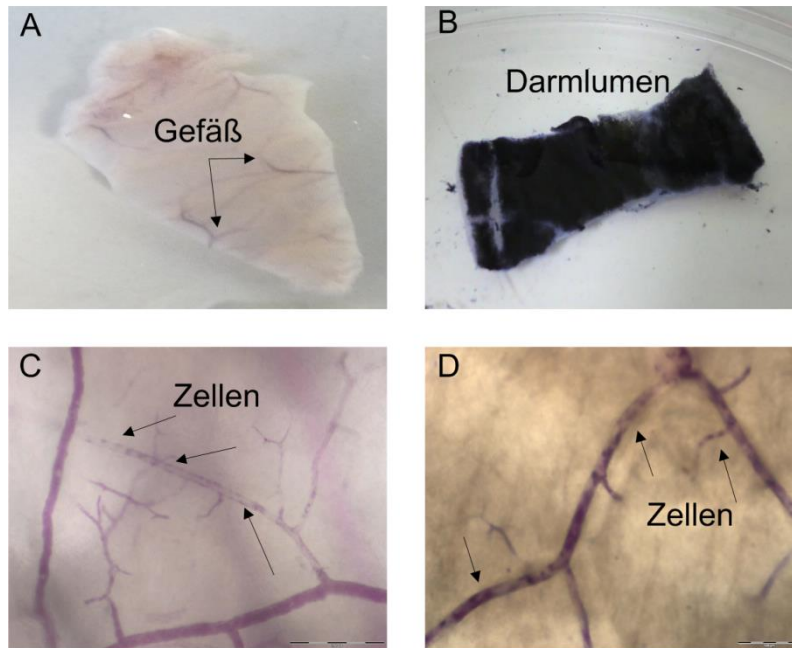


Abbildung 46: Das mit MTT behandelte autologe Implantat nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktor. (A+B) Makroskopische Aufnahme einer besiedelten BioVaSc. Die Gefäße (A) und das aufgeschnittene Lumen der BioVaSc (B) sind deutlich mit stoffwechselaktiven Zellen besiedelt. Mikroskopische Aufnahmen (C + D) der vaskulären Strukturen der BioVaSc. Die Zellen sind als blaue Punkte in der BioVaSc erkennbar.

Mit Hilfe des MTT konnte eine Qualitätskontrolle zur Besiedlung des Lumens eingeführt werden. Dieses zeigt eine deutliche beidseitig blaue Färbung und ist somit mit Zellen besiedelt. Auch in den vaskulären Strukturen sind vitale Zellen durch eine blaue Färbung nachweisbar. Insgesamt wurden $n = 32$ besiedelte Matrices mit Hilfe des MTT-Test untersucht. Dabei zeigte sich bei der Besiedlung mit Endothelzellen eine Inhomogenität bei der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen. Eine Besiedlung des Lumens konnte nach den aktuellen Protokollen immer nachgewiesen werden. Eine Besiedlung des Selbigen macht durch die starke Färbung Aussagen über die Besiedlung des Gefäßsystems unmöglich.

4.7.2 Kontrolle der Zellvitalität und Gewebestruktur

Die Identität der Zellen wurde mit Hilfe Immunhistologischer Färbungen im Kapillarsystem und Lumen des autologen Transplantats nachgewiesen.

4.7.2.1 Identitätskontrolle und Steigerung der Besiedlungseffizienz im Kapillarsystem

Für ein funktionelles, vaskularisiertes autologes Implantat ist es notwendig, eine möglichst geschlossene Besiedlungsdichte der Blutgefäße mit Endothelzellen zu erreichen. Damit soll die Dichtigkeit des Gefäßsystems erhöht, die Thrombogenität

reduziert und die Angiogenese in die BioVaSc beschleunigt werden. Zusätzlich ist eine weitgehende Standardisierung der Prozessparameter, wie beispielsweise der bei der Besiedlung ausgeübte Druck, für einen GMP-Prozess unabdinglich. Hierfür wurde sowohl die Isolation, das Zellkulturmedium als auch die Besiedlungstechnik optimiert. Die Entwicklung der Ergebnisse für die Besiedlung des Gefäßsystems ist in Abbildung 47 dargestellt. Insgesamt ist das Protokoll über n = 23 Matrices für die Besiedlung mit mikrovaskulären Endothelzellen optimiert worden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

Tabelle 17 verwendete Antikörper

CD31	transmembranöses Glycoprotein mit einer Molekularenmasse von 130 kDa, gehört zur Familie der Immunoglobuline und wird von Endothelzellen und einigen Leukozyten exprimiert, Adhäsionsprotein mit homogener und heterophiler Bindungsstelle, wobei die homogene die transendotheliale Diapedese und der Passage durch extrazelluläre Membran von Leukozyten dient, die heterogenen enthalten Intigrine $\alpha v\beta 3$ und Glykosaminoglykane
vWF	Von-Willebrand-Faktor, Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII, wird vor allem von Endothelzellen aber auch von Megakaryozyten gebildet, außerdem befindet er sich in den α -Granula der Thrombozyten, wird das Endothel verletzt und die Gefäßwand freigelegt bindet der vWF an die Oberfläche und sorgt für die Bindung von Thrombozyten und ist somit an der extrinsischen Blutgerinnungskaskade beteiligt

In Abbildung 47 sind die immunhistologischen Färbungen gegen den in Tabelle 16 genannten Antikörpern dargestellt.

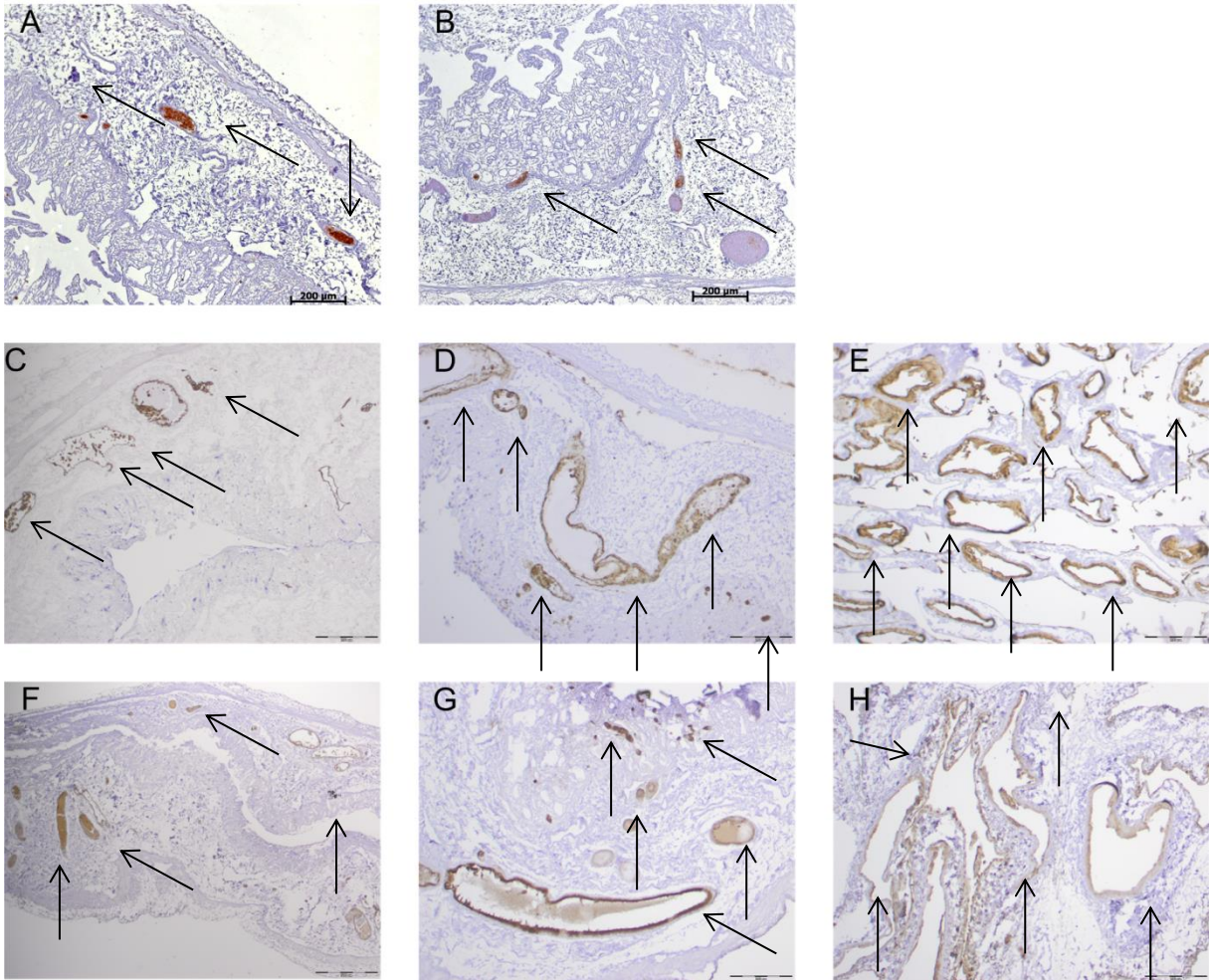


Abbildung 47: (A+B) Antikörperfärbung gegen CD31 (A) und vWF (B) einer nach dem herkömmlichen Protokoll besiedelten BioVaSc. (C)–(E) zeigt die Antikörperfärbung gegen CD31 und (F)–(H) die Bilder gegen den vWF nach dem entwickelten GMP konformen Protokoll. (A,B,C,D,F,G = Darmwand; E+ H= Mesenterium)

Die Antikörperfärbung gegen CD31 und den vWF (siehe Tabelle 16) zeigte, in der mit einer Spritze besiedelten BioVaSc, einige gefärbte Gefäßstrukturen. Deren Anzahl steigerte sich mit der Weiterentwicklung des Protokolls, so dass in diesem dann eine große Anzahl klein als auch größlumigere Strukturen, sowohl innerhalb der Tela Submucosa als auch im Mesenterium der BioVaSc, angefärbt und somit von Endothelzellen besiedelt sind. Im Lumen der Matrix wurden keine Endothelzellen nachgewiesen. Das ursprüngliche Protokoll konnte somit zu einer verstärkten Besiedlungsdichte mit mikrovaskulären Endothelzellen weiterentwickelt und die Besiedlung weiter standardisiert werden.

4.7.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde exemplarisch ein Paraffinschnitt, einer mit mikrovaskulären Endothelzellen rebesiedelten und zwei Wochen kultivierten BioVaSc untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 gezeigt.

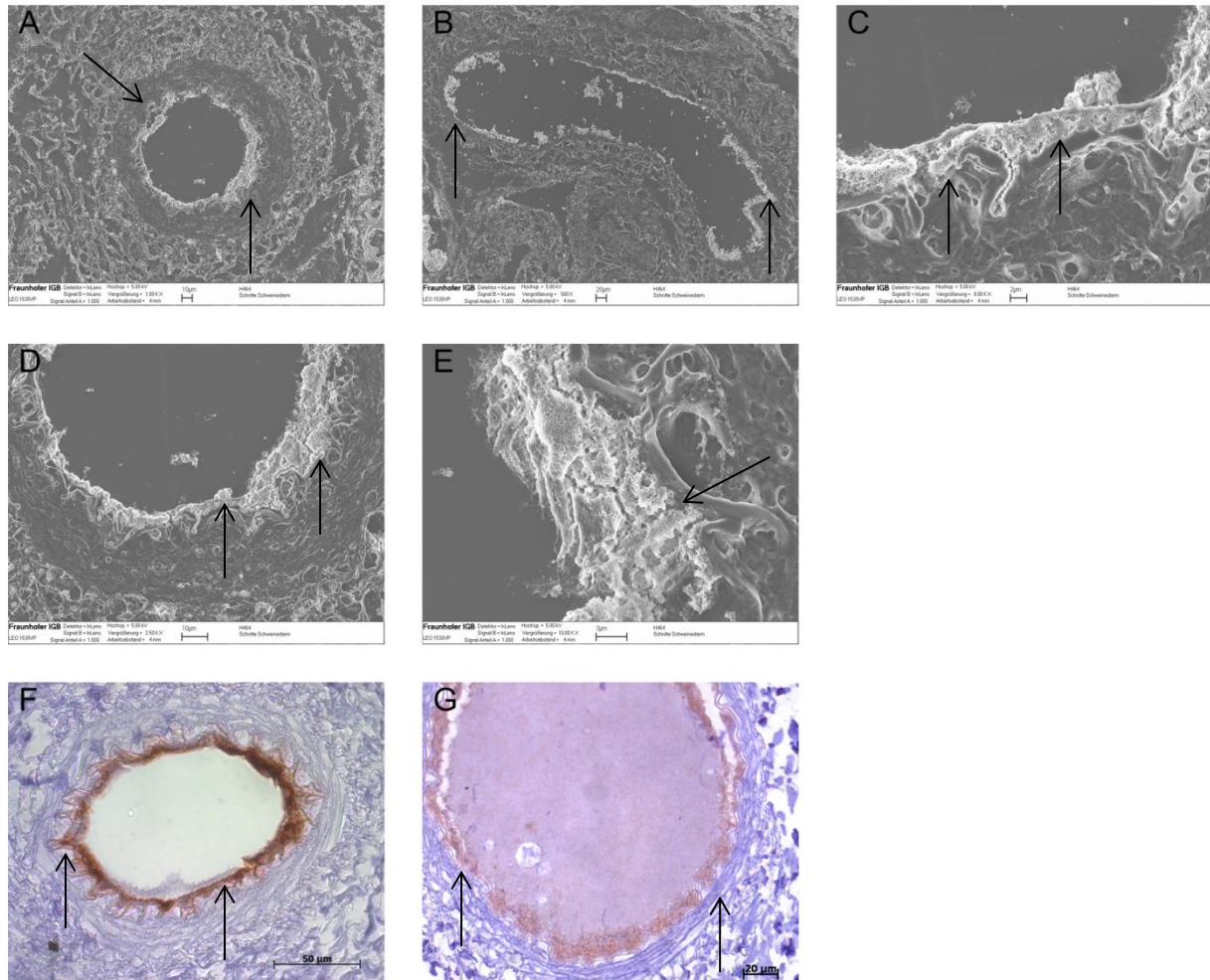


Abbildung 48: (A)-(E) REM Aufnahmen der Tela Submucosa einer mit mikrovaskulären Endothelzellen besiedelten Arterie. (F)+(G) Antikörperfärbung gegen den vWF (F) und gegen CD31 (G) auf Paraffinschnitten derselben besiedelten BioVaSc.

Durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten Zellen in den verbliebenen Gefäßstrukturen nachgewiesen werden. Die Zellen kleideten die Gefäßwände aus und das Lumen der Gefäße ist deutlich zu erkennen. Zusätzlich ist eine Antikörperfärbung desselben autologen Transplantats durchgeführt worden. Sie zeigt eine Expression der endothelialen Marker CD31 und vWF (Tabelle 16); somit ist die Identität der auskleidenden Zellen bestätigt worden.

4.7.6.3 Identitätskontrolle der Zellen im Lumen des autologen Transplantats

Die luminale Seite der BioVaSc wurde mit Skelettmuskelzellen und Fibroblasten besiedelt, um eine besseres Einwachsen bzw. Einheilen sowie die Stabilität des autologen Implantats zu erzielen und eine Calcifizierung zu verhindern. Zudem sollte durch die Besiedlung eine bessere Vernährbarkeit durch eine Erhöhung der Stabilität der Matrix erzielt werden. Paraffinschnitte von n=13 mit Endothelzellen, Fibroblasten und Skelettmuskelzellen besiedelten Matrices sind im Anschluss mit immunhistochemischen Methoden (Tabelle 17) untersucht worden.

Tabelle 18: Verwendete Antikörper

Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen	PCNA; Ringklemmenprotein welches die DNS von Eukaryonten während der Replikation umgibt, sorgt während der S-Phase des Zellzyklus für eine Unterbrechungsfreie und schnelle Vervielfältigung der DNS
Prolyl-4-hydroxylase (Fibroblast)	Enzymkomplex der die Hydroxylierung von Prolyresten katalysiert. Er ist essentiell für die Kollagensynthese. Er kommt in Fibroblasten und weiteren Zelltypen vor, wird allerdings nicht von allen Körperzellen exprimiert.
Desmin	Zum Zyotskelett gehörendes Typ-3 Intermediärfilament;: hauptsächlich in der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur vorhanden; es verbindet die Myofibrillen der quergestreiften Muskulatur zu Bündeln bzw. die Z-Scheiben der Muskelfasern
Vimentin	Typ 3- Intermediärfilament des Zytoskeletts, es kommt im Zytoplasma (teilweise im Nucleolus) von Zellen mesenchymaler Herkunft vor, somit beispielsweise in Fibroblasten, Endothel- und Muskelzellen, über die genaue Funktion ist wenig bekannt, wird in diesem Fall als positiv Kontrolle verwendet

In Abbildung 49 sind die immunhistologischen Färbungen gegen den in Tabelle 17 genannten Antikörpern dargestellt.

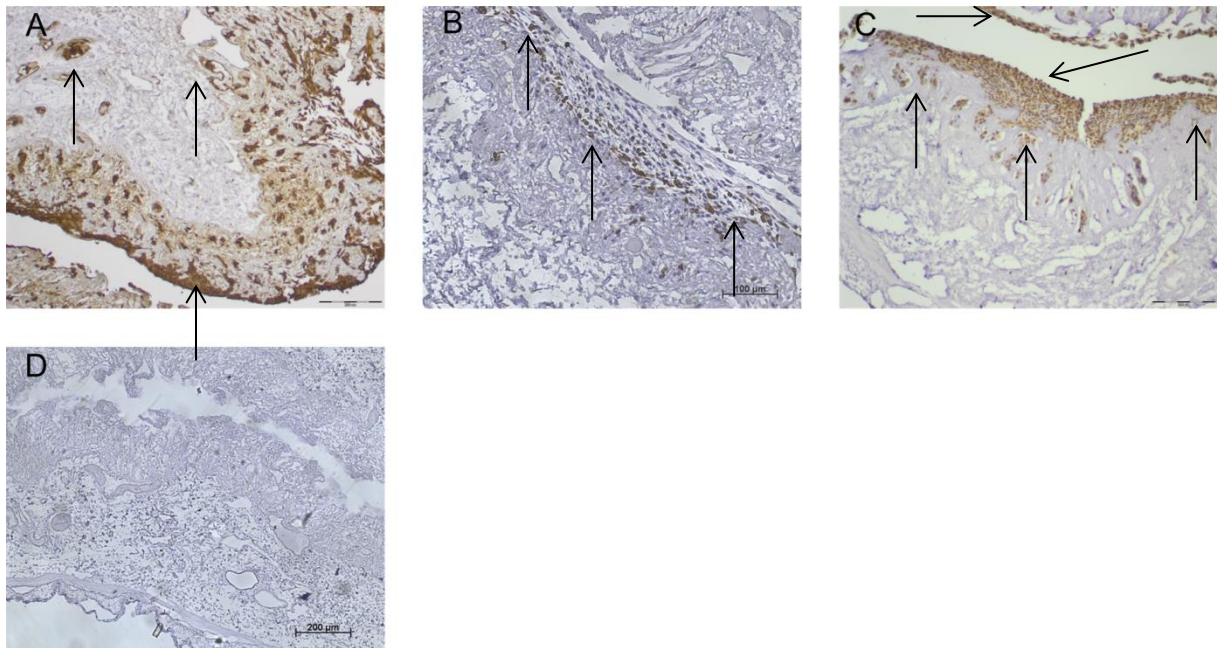


Abbildung 49: Antikörperfärbung von Paraffinschnitten der Darmwand gegen Vimentin (A), Desmin (B), PCNA (C) und Prolyl-4-hydroxylase (D). Der zytoskelettmarker Vimentin ist für alle Zellen positiv und zeigt eine deutliche Besiedlung des Lumens, allerdings ist nur ein geringer Teil dieser Zellen positiv für Desmin. Die Proliferation der Zellen kann durch PCNA nachgewiesen werden. Für Fibroblasten viel die Färbung negativ aus.

Die Immunohistochemische Färbung des besiedelten Darmlumens zeigte eine hohe Besiedlungsdichte, was durch die braune Färbung gegen Vimentin nachweisbar ist. Da diese Färbung aber sowohl Endothelzellen, als auch Fibroblasten und Muskelzellen anfärbt ist keine Unterscheidung der Zelltypen möglich. Die Färbung gegen PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) zeigt an, dass die Zellen im Lumen proliferativ sind. Ein Teil der Zellen zeigt sich außerdem positiv für Desmin, da dies allerdings auch nicht von 100% der Muskelzellen (siehe 4.4.1) exprimiert wird, kann es nicht zur Unterscheidung von Muskelzellen und Fibroblasten herangezogen werden. Die Prolyl-4-hydroxylase ist nicht nachweisbar. Somit ist es anhand der histologischen Färbungen nicht möglich zwischen Fibroblasten und Skelettmuskelzellen zu unterscheiden.

4.7.6.4 Durchfluss nach der zweiwöchigen Kultur im Bioreaktorsystem

Das entwickelte autologe Implantat bietet die Möglichkeit zur Anastomose an den Blutkreislauf. Damit ist die Versorgung der Zellen über einen großen Bereich gewährleistet. Ziel der Untersuchung ist es, den venösen Rückfluss einer sowohl im Lumen als auch im Kapillarsystem rebesiedelten BioVaSc zu bestimmen. Diese Messung ist bei $n = 8$ rebesiedelten Exemplaren durchgeführt worden. Über die

Bestimmung des Durchflusses soll indirekt die Besiedlungsdichte und somit eines funktionellen Assay zur Freigabe des Implantats ermittelt werden.

Bei $n = 4$ besiedelten Implantaten kam es zu keinem, bei $n = 1$ zu einem 2%igen Rückfluss aus der angeschlossenen Vene. Die restliche Flüssigkeit trat über die gesamte Fläche der BioVaSc aus. Bei einem Implantat war der gemessene Rückfluss mit 15% des injizierten Puffers bestimmbar. Zwei besiedelte BioVaSc waren nach der Besiedlung im Bereich des Pedikels verstopft.

4.8 Andere Zellquellen

Als zusätzliche Zellquellen wurden in dieser Arbeit die unter Abschnitt 3.2.1.5 beschriebenen upcyte mvEC und die unter Abschnitt 3.2.1.4 beschriebenen mesenchymalen Stammzellen verwendet.

4.8.1 Verwendung von upcyte mvEC

Die Expression der zelltypischen und in der Literatur beschriebenen Marker kann zwischen einzelnen Spendern variieren (siehe Abschnitt 4.4.1) und ist im Voraus schwer abschätzbar. Zusätzlich können sich Unterschiede in der Proliferation der Zellen, beispielsweise durch Vorerkrankungen der Patienten, ergeben, welche zu einer unterschiedlichen Besiedlung der BioVaSc führen könnten. Diese Problemstellung lässt sich mit der Verwendung der hochproliferativen upcyte mvEC der Firma Medicyte umgehen. Zusätzlich zeigen diese eine stabile Expression endothelspezifischer Marker und ermöglichen so eine Validierung des Systems mit den immer gleichen, hochproliferativen Zellen. Die upcyte mvEC wurden im Rahmen einer Doktorarbeit entwickelt [111] und zur Besiedlung des Gefäßsystems von drei BioVaSc verwendet (Abschnitt 3.2.1.5). Nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktorsystem wurde eine Lebend/Tot Färbung (Abschnitt 3.4.3.2) sowie ein Vitalitätstest (Abschnitt 3.4.3.3) und histologische Untersuchungen (Abschnitt 3.4.1.2 / 3.4.1.3) der rebesiedelten Matrices durchgeführt (Abbildung 50).

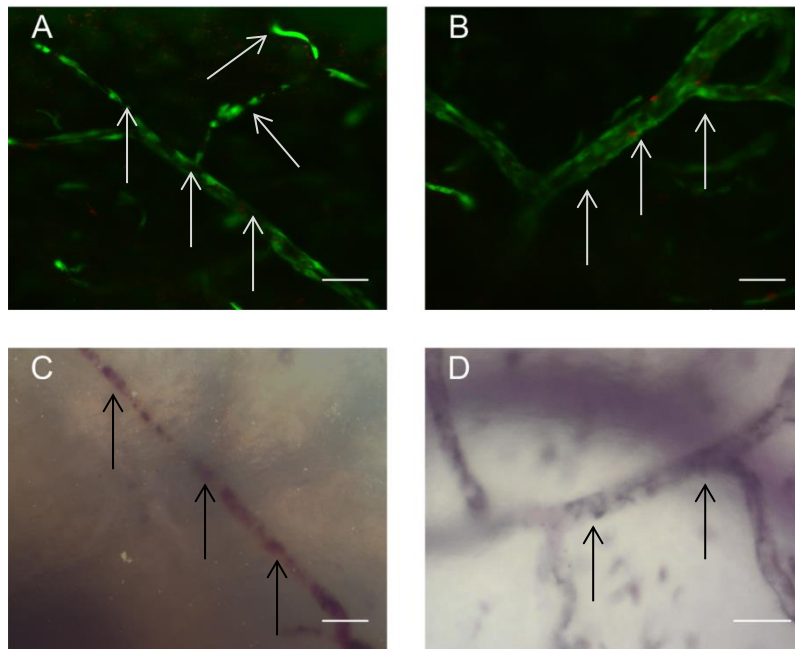


Abbildung 50: (A)+(B) Lebend/Tot Färbung der mit upcyte mvEC besiedelten BioVaSc. In grün sind die vitalen Zellen in den vorhandenen vaskulären Strukturen dargestellt. Nur vereinzelt sind Zellen nicht mehr vital (rot). (C)+(D) MTT Färbung der Gefäße. vitale Zellen sind blau eingefärbt.

In den Gefäßstrukturen der BioVaSc ließen sich lebende Zellen nachweisen, diese hatten eine intakte Zellmembran, so dass das im Zytoplasma durch Esterasen entstandene grünfluoreszierende Fluorescein die Zellen nicht mehr verlassen konnte, wodurch diese grün leuchteten. Tote Zellen erschienen durch den Nukleinsäure Indikator Prodidiumjodid rot und waren nur vereinzelt zu finden.

Dieses Ergebnis ließ sich durch den Vitalitätstest bestätigen. Lebende Zellen wandeln hierbei das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das blau-violette Formazan um. Die mikroskopischen Aufnahmen durch die BioVaSc zeigen vitale Zellen innerhalb der Gefäßstrukturen der BioVaSc.

Im Anschluss erfolgte die histologische bzw. immunhistologische Analyse (Tabelle 18) der besiedelten BioVaSc.

Tabelle 19: Zur Charakterisierung der mit upcyte mvEC besiedelten Matrices verwendete Marker

CD31	transmembranöses Glycoprotein mit einer Molekularenmasse von 130 kDa, gehört zur Familie der Immunglobuline und wird von Endothelzellen und einigen Leukozyten exprimiert, Adhäsionsprotein mit homogener und heterophiler Bindungsstelle, wobei die homogene die transendotheliale Diapedese und der Passage durch extrazelluläre Membran von Leukozyten dient, die heterogenen enthalten Intigrine $\alpha v\beta 3$ und Glykosaminoglykane
vWF	Von-Willebrand-Faktor, Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII, wird vor allem von Endothelzellen aber auch von Megakaryozyten gebildet, außerdem befindet er sich in den α -Granula der Thrombozyten, wird das Endothel verletzt und die Gefäßwand freigelegt bindet der vWF an die Oberfläche und sorgt für die Bindung von Thrombozyten und ist somit an der extrinsischen Blutgerinnungskaskade beteiligt,
eNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase, katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin, sorgt indirekt über cGMP für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation

In Abbildung 51 sind die histologischen bzw. immunhistologischen Analysen der mit upcyte mvEC besiedelten BioVaSc dargestellt.

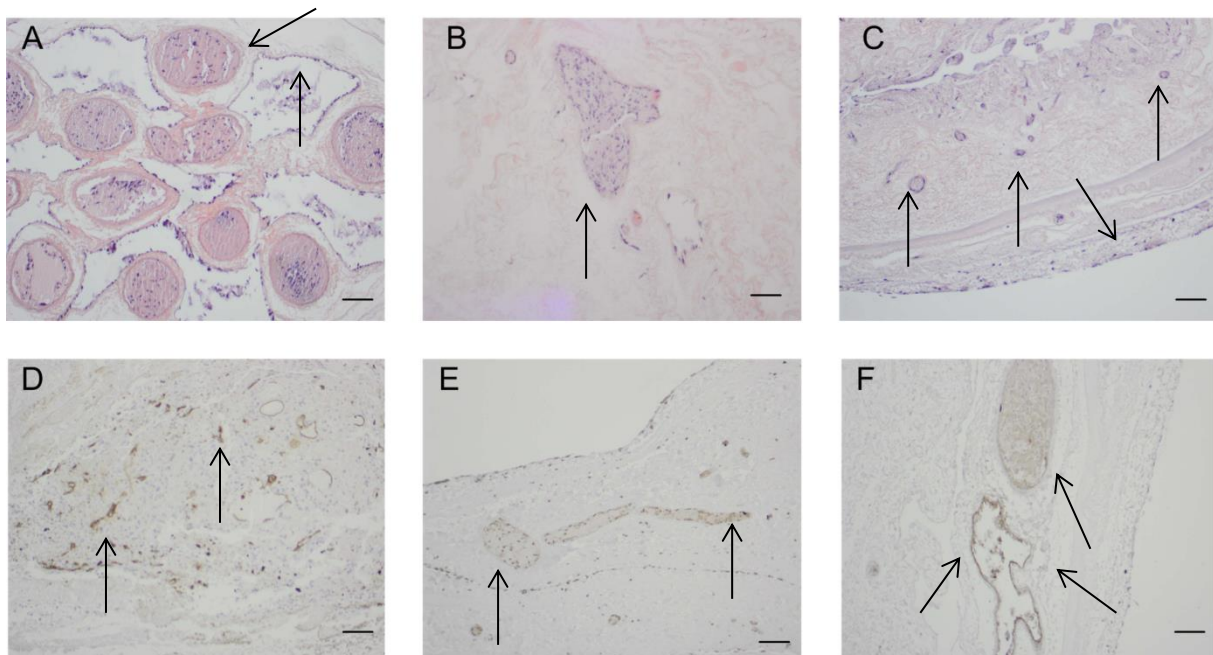


Abbildung 51: (A) H&E Färbung eines Paraffinschnitts des Mesenteriums (B+C) H&E Färbung von Paraffinschnitten der Darmwand der mit upcyte mvEC besiedelten BioVaSc. Die Zellen besiedelten sowohl die Gefäße als auch das Lumen und die seröse Seite der Matrix. Sie exprimieren die Marker CD31 (D), eNOS (E) und den vWF (F).

Die H&E Färbung zeigte eine Besiedlung der verbliebenen, vaskulären Strukturen mit upcyte mvEC. Diese stellten sich in dieser Färbung blau dar. Außerdem konnten sie im Darmlumen und auf der Außenseite der Matrix gefunden werden. Die immunhistologische Analyse der BioVaSc ergab eine positive, braune Färbung für

der endothelialen Marker CD31, eNOS und den vWF. Wobei die Zellen auch hier in den Gefäßstrukturen, im Darmlumen und auf der Außenseite der Matrix nachweisbar waren.

4.8.2 Verwendung mesenchymalen Stammzellen

Für die Entwicklung zellbasierter humaner Transplantate ist eine für den Patienten möglichst wenig belastende Gewinnung der Zellen wünschenswert. Das Verfahren zur Isolation von humanen adulten Stammzellen aus dem Knochenmark ist schon lange im klinischen Einsatz etabliert und die Biopsieentnahme beinhaltet wenige und bekannte Risiken. Als alternative Zellquelle zur Entnahme von Haut zur Gewinnung von Endothelzellen wurde die Isolation von mesenchymalen Stammzellen in Erwägung gezogen. Zur Evaluierung von Knochenmarkspirat als Zellquelle sind drei BioVaSc mit 2-20 Millionen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark besiedelt und auf die Ausbildung endothelspezifischer Marker (Tabelle 19) untersucht worden.

Tabelle 20: verwendete Antikörper

CD31	transmembranöses Glycoprotein mit einer Molekularenmasse von 130 kDa, gehört zur Familie der Immunoglobuline und wird von Endothelzellen und einigen Leukozyten exprimiert, Adhäsionsprotein mit homogener und heterophiler Bindungsstelle, wobei die homogene die transendotheliale Diapedese und der Passage durch extrazelluläre Membran von Leukozyten dient, die heterogenen enthalten Intigrine $\alpha\beta3$ und Glykosaminoglykane
vWF	Von-Willebrand-Faktor, Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII, wird vor allem von Endothelzellen aber auch von Megakaryozyten gebildet, außerdem befindet er sich in den α -Granula der Thrombozyten, wird das Endothel verletzt und die Gefäßwand freigelegt bindet der vWF an die Oberfläche und sorgt für die Bindung von Thrombozyten und ist somit an der extrinsischen Blutgerinnungskaskade beteiligt

In Abbildung 52 sind die Ergebnisse des MTT Test sowie immunhistologischer Färbungen mit den in Tabelle 19 genannten Antikörpern dargestellt.

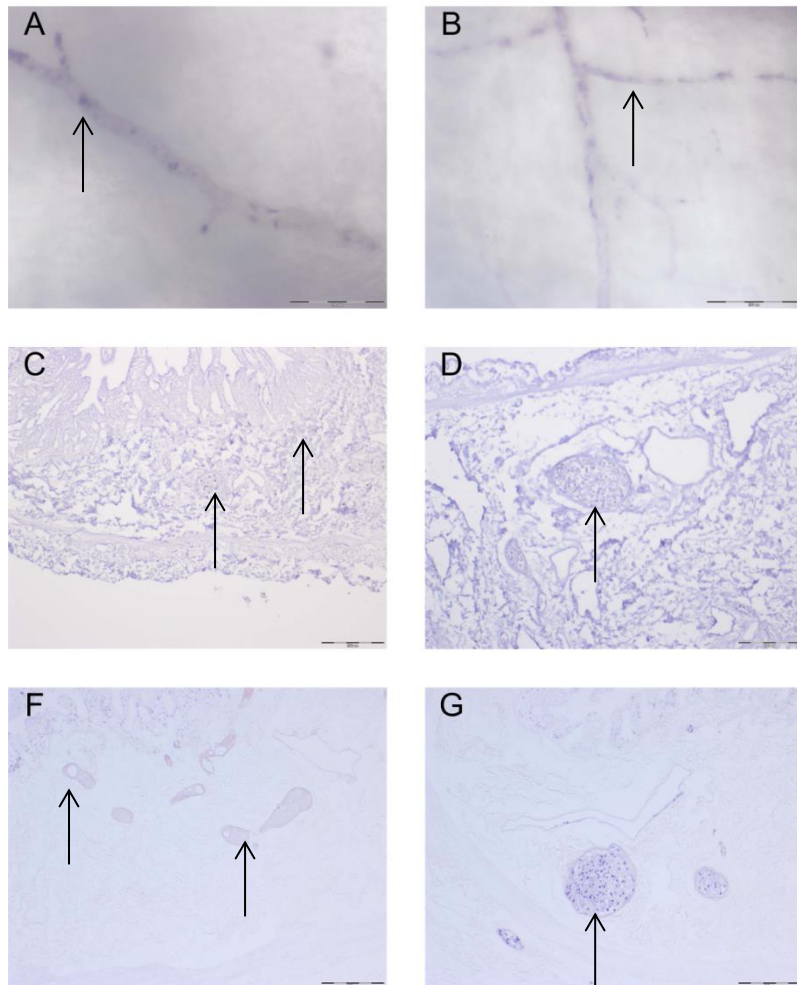


Abbildung 52: Mit mesenchymalen Stammzellen besiedelte BioVaSc. (A)+(B) Durch das zugegebene MTT färben sich die vitalen Zellen blau und sind in den vaskulären Strukturen sichtbar. (C)-(E) Immunhistochemische Analyse der rebesiedelten Matrix mit Antikörpern gegen vWF (C) und CD31 (D). Es konnte keine Färbung nachweisen werden. (F)+(G) H&E Färbung; Die vaskulären Strukturen sind teilweise mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt.

Der MTT Test zeigt nach zweiwöchiger Kultur vitale, blau gefärbte Zellen in den Gefäßstrukturen, allerdings war durch die immunhistologische Färbung keine endothelspezifischen Differenzierung (vWF, CD31) nachweisbar. Die H&E Färbung zeigte eine inhomogene Besiedlung der vaskulären Strukturen über die BioVaSc. Einige Gefäßäste waren stark, einige überhaupt nicht besiedelt. Nach den drei Ansätzen wurde die Besiedlung mit mesenchymalen Stammzellen nicht mehr weiterverfolgt, da die vorliegenden Daten beim verwendeten Versuchsaufbau keinen Erfolg brachten. Die weiteren Versuche zur Besiedlung des Gefäßsystems wurden dann mit mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt.

5. Diskussion

Das Forschungsgebiet der Regenerativen Medizin arbeitet mit Zelltherapeutika, künstlichen Geweben oder bioartifiziellen Konstrukten, um alternative Behandlungsmöglichkeiten für besondere bisher nicht therapierbare Gewebedefekte zu finden. Hierzu werden Zellen auf Trägerstrukturen aus verschiedensten Biomaterialien aufgebracht, kultiviert und schließlich in den Patienten implantiert. Großflächige Verletzungen oder Erkrankungen der Trachea stellen hierbei eine große Herausforderung dar. Bisher haben weder Allografts [113], noch synthetische Prothesen [114] oder auch autologe Gewebe [115] zu verbreiteter klinischer Akzeptanz geführt. Die spezielle Blutgefäßanatomie der Trachea [32] sorgt für Probleme bei der Vaskularisierung. Die Luftröhre hat keinen eigenen Zugang zum Blutgefäßsystem sondern wird über kleinlumige Verzweigungen des Netzwerks der Schilddrüsengefäße oder der Bronchialarterien versorgt [11, 32]. Ein idealer Ersatz der Luftröhre sollte funktionell, biokompatibel, beständig und nicht thrombogen oder kanzerogen sein. Er sollte nicht inflamatorisch wirken und eine Resistenz gegen Infektionen besitzen [116] longitudinal flexibel sein und seitliche Stabilität [25] aufweisen. Außerdem muss er sich in das Gewebe des Patienten integrieren [46]. Eine Vaskularisierung beugt zusätzlich Nekrosen vor [117, 118], ein mögliches Längenwachstum ist vor allem bei Kindern wichtig [116].

Zur ersten humanen Verwendung eines Trachea Ersatzes aus der Regenerativen Medizin kam es 2002 mit einer Kollagen beschichteten *Marlex Mesh Tube*, welche mit venösem Blut benetzt und implantiert wurde. Nach zwei Monaten konnte in diesem Fall eine Epithelialisierung beobachtet werden. Die Gruppe erweiterte ihre Technik im Tier um die Rebesiedlung mit aus dem Fettgewebe stammenden Stammzellen und Fibroblasten [119-121]. Zusätzlich wurde auch mit Überzügen mit Polymeren experimentiert [121]. Da die Biokompatibilität weiter erhöht werden sollte, ist in einem dritten Ansatz die Kollagenbeschichtung zusätzlich mit peripherem Blut, Knochenmarksaspirat oder mesenchymalen Stammzellen beschichtet worden [122]. Auch die Verwendung von iPS-Zellen wurde im Tier getestet [123]. 2004 kam es zum ersten Einsatz der, auch in dieser Arbeit verwendeten, BioVaSc (**B**iological **V**ascularized **S**caffold), welche hierzu mit autologen Muskelzellen und Fibroblasten besiedelt und drei Wochen kultiviert wurde. Im Anschluss erfolgte die erfolgreiche Implantation in einen Patienten mit trachealer Fistel [51]. Ein weiterer Ansatz in

diesem Jahr war die Verwendung von allogenen Aortengewebe [52]. Dies war zuvor schon im Tierversuch erprobt worden [115, 124] und wurde nun an zwei Patienten angewendet. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie mit sechs Patienten bestätigt [125]. 2008 wurde eine Spender Trachea azellularisiert und für 96 Stunden mit, aus mesenchymalen Stammzellen differenzierten, Chondrocyten und Zellen des respiratorischen Epithels besiedelt und in einem dafür angefertigten, rotierenden Bioreaktor kultiviert. Nach anschließender Implantation konnte bei einer Biopsieentnahme nach vier Wochen eine Blutung festgestellt werden, was als Zeichen einer indirekten Vaskularisierung gedeutet wurde [53]. Im Jahre 2010 bekamen Prof. Thorsten Walles und sein Team den von-Langenbeck Preis für sein Operationsverfahren zur Behandlung schwerer Luftröhrenverletzungen mit einer mit mikrovaskulären Endothelzellen und Muskelzellen besiedelt BioVaSc. 2011 kam eine Prothese zum Einsatz, welche zuvor speziell für diesen Patienten gefertigt worden war. Nach 5 Monaten zeigte sich ein erfolgreiches Einheilen der Prothese [54]. Im darauffolgenden Jahr ist von der erfolgreichen Therapie eines Kindes berichtet worden [55]. Im Alter von 10 Jahren kam es zum Einsatz einer humanen, azellularisierten Spender Trachea, welche mit mesenchymalen Stammzellen und Gewebestücken aus dem respiratorischen Epithel des Patienten besiedelt war. Das Kind ist seit dem Einsatz der Prothese problemlos 11 cm gewachsen [55].

Keines dieser Transplantate ist bisher in systemischen, klinischen Studien überprüft worden. Hierfür ist die Beantragung bzw. Erteilung einer Herstellerlaubnis notwendig, welche in Deutschland vom Regierungspräsidium in Verbindung mit dem Paul-Ehrlich-Institut erteilt wird. In weiterführenden Studien wird sich zeigen welches dieser Produkte dabei das größte Erfolgspotential aufweist.

5.1 Herstellung der biologisch vaskularisierten Matrix

In dieser Arbeit wird mit einer porcinen Matrix gearbeitet. Sie besteht, wie das sich bereits im klinischen Einsatz befindliche Medizinprodukt die **Small Intestine Submucosa (SIS)** [126, 127], aus porcinem Dünndarm. Im Gegensatz zur SIS bleiben bei der Präparation die natürlichen vaskulären Strukturen erhalten und können für eine erneute Besiedlung mit humanen Zellen genutzt werden. Die Gewinnung der Matrix geschieht unter aseptischen Bedingungen in der experimentellen Medizin in Tübingen. Sie besteht aus einem Stück porcinem

Jejunum, den dazugehörigen vaskulären Strukturen und einem arteriellen Zulauf sowie dem dazugehörigen venösen Ablauf [75-77, 79]. Bei der Entnahme der Matrix war das Gefäßsystem, je nach Präparationsart und Anatomie des Schweines, unterschiedlich dicht. Das bedeutet, dass nachdem arteriell Flüssigkeit zugeführt wird, diese nicht nur über den venösen Ablauf austritt, sondern sich über das komplette Gewebe verteilt. Durch die Verwendung eines Elektroskalpells konnte die Dichtigkeit des Systems erhöht und somit der venöse Rückfluss verstärkt werden. Ein Einfluss auf die Azellularisierung war allerdings nicht erkennbar. Diese dient der Entfernung aller porcinen und bakteriellen Bestandteile aus der Matrix, um spätere Immunreaktionen im Patienten zu verhindern. Da Rückstände des zur Azellularisierung verwendeten Natriumdesoxycholats bei der späteren Rebesiedlung problematisch sein könnten, ist dessen Auswaschen überprüft worden. Hierbei wurde die Nachweisgrenze des Tests erreicht. Da in gesunden Personen ein Gallsäurewert von 2-10 $\mu\text{mol/l}$ im Blutserum als normal angesehen wird, kann davon ausgegangen werden, dass eine Rebesiedlung nicht beeinflusst wird. Das zur Azellularisierung angedachte Protokoll wies Zell- und DNS Reste im Bereich der Mucosa auf. Nach der Optimierung erfolgte dann die Überprüfung der Endotoxinwerte. Diese waren mit durchschnittlich 31.5 EU/ml deutlich über dem als risikolos betrachteten Bereich von 0,5 EU/ml. Endotoxine sind Lipopolysaccharide der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien und werden vor allem durch deren Lyse während der Azellularisierung freigesetzt. Bei Implantation können sie nach Kontakt mit den Schleimhäuten oder bei Aufnahme in das Gefäßsystem zu Fieber führen. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen und über diese zur Entzündung oder Apoptose. Da gramnegative Bakterien in sehr großer Anzahl in der natürlichen Darmflora vorkommen, ist bei einer Matrix aus porcinem Schweinedarm verstärkt von einer Endotoxinbelastung auszugehen. Durch die Umstellung des Protokolls konnten im Verlauf dieser Arbeit die Anforderungen der guten Herstellungspraxis erfüllt werden. Insgesamt sind hierzu vier Protokolle entwickelt worden. Zunächst führte die Umstellung des Protokolls zu einer verschlechterten Azellularisierung und somit zu Zell- und DNS Resten innerhalb der BioVaSc. Diese konnten durch Änderungen im Protokoll beseitigt werden, allerdings waren die ermittelten Endotoxinwerte oberhalb des gesetzlichen Grenzwertes von 0,5 EU/ml. Mit den daraufhin umgesetzten Modifikationen konnten die gesetzlichen Grenzwerte

der Endotoxinbelastung eingehalten und die Matrices erfolgreich azellularisiert werden. Das Protokoll entsprach hinsichtlich der verwendeten Reagenzien allerdings noch nicht der guten Herstellungspraxis. In dieser soll weitgehend auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet werden, da der Anteil an Patienten mit Allergien auf Antibiotika zunimmt und dies nach erfolgreicher Implantation zu Problemen führen könnte. Außerdem ist es möglich, dass durch den Einsatz von Antibiotika eine bakterielle Kontamination soweit gebremst wird, dass sie während des Kulturzeitraums nicht erkennbar ist und erst nach erfolgreicher Implantation im Patienten hervorbricht. Durch starkes Verkürzen des Protokolls und optimierte Präparationszeiten konnte auf den Einsatz von Gentamicin, Streptomycin und Penicillin während der Azellularisierung verzichtet werden. Im Transportmedium ist Gentamicin enthalten, um in der Zeit direkt nach der Präparation das bakterielle Wachstum zu minimieren. Die unter GMP-Bedingungen verwendeten Materialien müssen möglichst genau spezifiziert sein. Deshalb ist das für die DNS Reduktion verwendete Enzym auf die besser spezifiziert und in GMP Prozessen schon angewendete Benzonase umgestellt worden. Die qualitative, histologische Analyse dieser azellularisierten Matrices zeigte sowohl DNS- als auch Zellfreiheit. In der quantitativen Analyse ergab sich eine Abreicherung um 97% der DNS im Vergleich des nativen Gewebes zum fertigen Produkt. Der DNS-Gehalt der BioVaSc betrug im Mittel 86 ng/mm^2 nach der Sterilisation, bei einer Wiederfindungsrate von 25%. Die zugelassenen SIS hingegen enthält mit $0,03 \text{ ng/mm}^2$ einen geringeren Anteil an DNS-Resten, was in der Entfernung der mucösen Schicht begründet liegen könnte. Trotz der Entfernung der zellulären und bakteriellen Bestandteile könnte es nach Implantation des autologen Implantats zu einer chronischen Abstoßung kommen. In der Literatur sind immunologische Reaktionen auf xenogene zellfreie Matrices beschrieben worden [128-130]. Hierfür können in der Matrix zurückgebliebene DNS-Reste eine Ursache sein. Die Länge der Fragmente spielt dabei eine große Rolle. Fragmente unter 200 BP werden im Körper schnell abgebaut und spielen bei der Immunantwort eher eine untergeordnete Rolle [63, 131]. Der Verdau mit Benzonase soll in diesem Fall für eine starke Degradation der nach der Azellularisierung noch enthaltenen DNS sorgen und damit für eine geringere Abstoßungsgefahr für den Patienten. Die Immunantwort kann zusätzlich von der klinischen Verwendung, der tierischen Herkunft und durch das Herstellungsverfahren beeinflusst werden.

Zusammengefasst können je nach Matrix chronische Entzündungen, die Degradation oder Verkapselungen auftreten [128-130]. Es gibt in der Literatur Studien zum Vergleich verschiedener biologischer Matrices. Die größte Immunantwort zeigt hierbei porcine SIS, die allerdings keinen Einfluss auf das Remodeling der Selbigen nahm [128].

Sowohl für die Nahtstabilität als auch die spannungsfreie Abdeckung eines Defekts ist die Stabilität und Elastizität der Matrix von großer Bedeutung. Außerdem ist die funktionelle Stabilität im Patienten nachher von großer Bedeutung, da das Transplantat durch eine eventuelle notwendig künstliche Beatmung, beim Husten oder körperlicher Bewegung Belastungen ausgesetzt wird. Durch Reißtests sollte der Einfluss verschiedener Lagertemperaturen auf die Stabilität der Matrix ermittelt werden. Hierbei betrug die maximale Zugspannung bei 4°C 3,32 N, bei 42°C, 2,96 N und bei 60°C 0,76 N. Somit sieht man bei den unterschiedlichen Lagertemperaturen einen Abbau des Kollagens. Zwischen 4°C und 42°C schreitet diese nur langsam voran, wobei es bei 60°C zur Degradation und somit auch zu einem Schwinden der Elastizität kommt. Die bei 4°C gelagerten Matrices waren zwischen 24-253 Tage in PBS+ gelagert bevor sie analysiert wurden. Hierbei schwankten die Messwerte zwischen 2,25 - 4 N, wobei keine Abhängigkeit von der Lagerdauer ersichtlich war. Für die BioVaSc könnte somit eine Haltbarkeit von 3 Monaten festgelegt werden, da über diesen Zeitraum keine Veränderungen detektierbar waren. Qualitativ konnten über Immunhistologische Färbungen Kollagen 1 und 3, Fibronectin und Heperansulfat in der BioVaSc nachgewiesen werden, allerdings reduzierter als im nativen Gewebe. Der Kollagenanteil ist dabei am höchsten und soll im Anschluss an diese Arbeit mittels ELISA-Test (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und auch Westernblot Analysen untersucht werden. Hierüber lässt sich eine Degradation im Kollagen genauer detektieren und somit die Haltbarkeit genauer spezifizieren.

Ein weiteres Augenmerk innerhalb der Validierung ist die Übertragung von tierischen Viren auf den Empfänger des Implantats. Dieses Thema wird bisher vor allem bei xenogenen Transplantationen diskutiert [132-136]. Hierbei werden allerdings komplett besiedelte Organe oder Gewebe tierischen Ursprungs in den Menschen gebracht. Hierbei kommen beispielsweise porcine endogene Retroviren (PERV) in Betracht. Hiervon gibt es drei Klassen PERV-A, PERV-B, PERV-C. PERV A und B

zeigen in vitro einen großen Wirtsbereich, der auch die Replikation in verschiedenen humanen Zelllinien mit einschließt [137, 138]. PERV-C hingegen hat einen eingeschränkten Wirtsbereich und die Replikation konnte in einigen porcinen Zelllinien und einer humanen Zelllinie nachgewiesen werden [138]. Somit zeigt sich, dass die isolierten PERV humane Zellen infizieren können und replikationskompetent sind. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Übertragung des porcinen Retrovirus von apoptotischen porcinen Zellen auf humanen Zellen sehr unwahrscheinlich ist [139-141]. Selbst bei direkter Co-Kultur konnte nur in 0,22% der humanen Zellen porcine DNS nachgewiesen werden, welche allerdings nach vierwöchiger Kultur abgebaut war [139]. Somit ist eine Übertragung durch die Matrix als unwahrscheinlich anzusehen. Im Rahmen der Gewährleistung der Patientensicherheit kann es jedoch notwendig sein, weiterführende Untersuchungen zur Virussicherheit durchzuführen, da das pathogene Potential durch eine Interspeziesübertragung im Moment nicht beurteilt werden kann. Im Moment sind keine Erkrankungen beschrieben, die durch PERV ausgelöst wurden. Zur Abklärung der Virussicherheit wird die Matrix im Anschluss an diese Arbeit auf folgende Viren untersucht: das Hepatitis E Virus, das Rotavirus, das Encephalomyocarditis auslösende Virus, porcines Enterovirus Typ 1 und Typ 3, porcines endogenes Retrovirus, porcines Circovirus Typ 1 und 2, porcines Cytomegalovirus und das porcine Impmotropes Herpesvirus Typ 2. Hierbei geht es nicht nur um eine direkte Übertragung der Viren auf den Menschen sondern auch um ein mögliches Reassortment humaner und porciner Virenstämme. Darunter versteht man die Vermischung oder Umverteilung der genetischen Information zweier Viren. Diese sind meistens Subtypen einer Virusspezies oder nahe Verwandte einer Gattung. Hierfür müssen die Viren dieselbe Zelle infizieren und sich in ihr vermehren und ihr Genom muss zusätzlich aus mehreren Abschnitten bestehen. Durch die Implantation der porcinen Matrix könnten porcine und humane Viren dieselbe Zelle infizieren und somit einen neuen viralen Subtyp schaffen [142, 143]. Deshalb ist es notwendig, die in der BioVaSc nach der γ -Bestrahlung möglicherweise noch enthaltene virale DNS zu analysieren. Dies geschieht über molekularbiologische Methoden durch die Firma Living Cell Technologies aus Neuseeland im Anschluss an diese Arbeit. Des Weiteren wird die Matrix zusätzlich auf die Belastung mit Mycoplasmen und Toxoplasma gondii getestet.

5.2 Isolation und Kultivierung der humanen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten aus adulter Haut und Skelettmuskelzellen isoliert. Die hierfür etablierten Medien entsprechen, soweit möglich, der GMP-Zertifizierung. Im Moment gibt es keine für die Arzneimittelherstellung zugelassenen Zellkulturmedien für die hier verwendeten primären Zellen, so dass Kompromisse notwendig sind. Nach Möglichkeit sollten alle Medien frei von tierischen Komponenten sein, um so die Übertragung eventuell vorhandener tierischer Viren auf den Empfänger zu vermeiden. In den durchgeführten Medientests wurde kein geeignetes Zellkulturmedium gefunden, bei welchem beispielsweise auf fötales Kälberserum verzichtet werden konnte. Auch die Kontrolle der Supplemente steht im Detail noch aus. Diese sind rekombinant in Bakterien hergestellt worden, was bedeutet, dass die für das Wachstum der Bakterien verwendete Nährmedien auch frei von tierischen Bestandteilen sein müssen und zusätzlich genau zertifiziert sein sollten. Diese Details sind noch mit den Behörden zu diskutieren.

Durch die Spendervarianz kann es zu einem unterschiedlichen Verhalten der Zellen bei der Besiedlung kommen. Bei der immunhistologischen Charakterisierung der Zellen über 4 Passagen zeigte sich teilweise Spenderabhängig ein sehr unterschiedliches oder auch konstantes Expressionsmuster. Bei den mikrovaskulären Endothelzellen war die Expression von CD31 über vier Passagen gleichmäßig hoch. Die Bildung und Sekretion des vWF von Endothelzellen ist schon seit vielen Jahren in der Literatur beschrieben [144-147]. Bei der Quantifizierung der erhobenen Daten, war eine Abhängigkeit vom Spender festzustellen. Abhängig vom Spender war es nicht möglich, den vWF in der immunhistologischen Analyse der Zellkultur nachzuweisen. Bei diesen Spendern reichten vermutlich die gegebenen Bedingungen nicht für die Stimulation der Expression des vWF aus. Durch weitere Forschungen müssten die Kultur der Zellen überprüft und gegebenenfalls angepasst werden. Der Fibroblastenmarker gegen die Prolyl-4-hydroxylase färbte die Endothelzellen nicht an und kann damit Aufschluss über die Reinheit der Kultur geben. Die Fibroblasten zeigten keine Kreuzreaktivität, mit den für die Skelettmuskelzellen bestimmten Markern. Des Weiteren exprimierten sie Kollagen 1 und circa ein Drittel der Zellen auch den typischen Oberflächenmarker für Fibroblasten die Prolyl-4-hydroxylase. Hierbei ist spenderabhängig eine hohe

Standardabweichung auffällig, die nicht auf bekannte Merkmale zurückgeführt werden kann. Bei der Isolation von Skelettmuskelzellen werden sogenannte Satellitenzellen gewonnen, aus welchen der Körper seine Muskeln *in vivo* regeneriert [148]. Dies führt bei der Kultur zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Zellen, da diese sich unterschiedlich schnell entwickeln. Einige Muskelmarker bräuchten auch zusätzliche mechanische Stimulation oder den Anreiz durch weitere Wachstumsfaktoren, um exprimiert zu werden [149]. Dies spiegelt auch das Expressionsmuster der Marker Desmin, Myogenin, Myosin und MyoD wieder, welche Spender- und Passagenabhängig gebildet werden. Kollagen 1 und der für Fibroblasten typische Marker Prolyl-4-hydroxylase sind von den Muskelzellen in ähnlichem Maße gebildet worden wie von den Fibroblasten. Da die Prolyl-4-hydroxylase an der Synthese des Kollagens beteiligt ist, ist hier auf jeden Fall eine Verbindung vorhanden. Die Verwendung des Elektroskalpells bei der Biopsieentnahme war ungeeignet, da es durch die Verbrennungen zu einer stark verringerten Vitalität der Zellen kam. Es war im Laufe der Arbeit nur einmal möglich, alle drei Zelltypen vom gleichen Spender zu isolieren. Mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten wurden ansonsten aus der Haut desselben Spenders gewonnen, wohingegen die zur Besiedlung verwendeten Skelettmuskelzellen von einem anderen Spender stammten. Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zelltypen sind aufgrund des fehlenden Immunsystems nicht wahrscheinlich, aber auch nicht völlig auszuschließen. Außerhalb der Validierungsphase kommen alle Zelltypen vom späteren Empfänger des autologen Implantats, weshalb von einer weiteren Untersuchung dieser Problematik abgesehen wurde.

Die Spendervarianz im Bereich der Endothelzellen konnte durch die Besiedlung mit den upcyte mvEC (Medicyte) umgangen werden. Diese sind mit Hilfe eines viralen Transfersystems so verändert, dass die entsprechenden Proliferationsgene hochreguliert sind und die Zellen somit eine höhere Teilungsrate aufweisen ohne die Zellen zu immortalisieren. Die Differenzierung bleibt dabei erhalten. Mit diesen stark proliferativen Zellen konnte eine erhöhte Besiedlung der BioVaSc, mit Ausbildung endothelspezifischer Marker nachgewiesen werden. Hiermit könnte eine Validierung der Methoden ohne Spendervarianz durchgeführt werden. Die Zellen besiedelten sowohl die Gefäßstrukturen als auch das Lumen und die Außenseite des Darms und bildeten dabei endothelspezifische Marker aus. Die Vitalität konnte sowohl mit Hilfe

von MTT als auch mit einer Lebend/Tot-Färbung nachgewiesen werden. In dieser zeigten sich nur eine geringe Anzahl nicht vitaler Zellen. Die Lebend/Tot Färbung wurde auch an sechs mit primären Zellen besiedelten Implantaten durchgeführt, allerdings konnte bei keiner Zellen in den Gefäßen dargestellt werden. Da in der Histologie und mit Hilfe des MTT aber Zellen in den Gefäßstrukturen darstellbar waren, liegt es vermutlich am viel geringeren Stoffwechsel und somit an der viel geringeren Fluoreszenz, dass keine Darstellung am Laser Scanning Mikroskope möglich war.

Über die Isolierung von mesenchymalen Stammzellen liegen jahrelange Erfahrungen vor, was die Risiken für den Patienten besser einschätzbar macht [150-154]. Mit porcinen Stammzellen konnte in der BioVaSc eine Differenzierung Richtung Endothelzellen nachgewiesen werden [155]. In dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen in die Röhrenstrukturen der BioVaSc eingebracht, welche unter dem in der Bioreaktorkultur entstehenden pulsatilem Scherstress zur Differenzierung gebracht werden sollten. Es konnte allerdings in den drei durchgeführten Ansätzen keine Ausbildung endothelspezifischer Marker beobachtet werden. Vielleicht müsste hierfür die Kulturzeit erhöht oder das Zellkulturmedium weiter angepasst werden. Die Verlängerung der Kulturzeit ist allerdings nicht so einfach möglich, da die Behandlung des Patienten nach Angaben der Chirurgen sechs Wochen nach der Entnahme OP erfolgen muss. Schon dieser Zeitrahmen ist für die schwerkranken Patienten sehr kritisch. Allerdings benötigt man im Labor mindestens drei bis vier Wochen für die Zellkultur womit noch zwei Wochen für die dynamische Kultivierung bleiben. Eine weitere Verlängerung der Kulturzeit ist im Rahmen der klinischen Vorgaben nur schwerlich umsetzbar. Im Gegenteil eine Verkürzung wäre wünschenswert. Somit wurden in dieser Arbeit die mikrovaskulären Endothelzellen als Zellquelle bevorzugt.

5.3 Herstellung des autologen Implantats

Durch die Besiedlung des Implantats mit autologen Zellen soll die Immunreaktion des Patienten herabgesetzt und der Einbauprozess beschleunigt werden. Die Besiedlung des Lumens mit Fibroblasten und Muskelzellen soll zusätzlich zur verminderten Abstoßungsreaktion zu einer Erhöhung der mechanischen Stabilität führen und somit für eine bessere Vernährbarkeit an den Wundrändern sorgen, während die Endothelzellen die Vernetzung mit dem körpereigenen Gefäßsystem erhöhen sollen.

Das in dieser Arbeit entwickelte autolog besiedelte Implantat ist im Rahmen von Heilversuchen in ähnlicher Form schon in der Klinik verwendet worden. Der erste Patient hatte aufgrund von Lungenkrebs einen 1,5 x 1,5 cm großen Defekt der Trachea, welcher mit einer mit Fibroblasten und Skelettmuskelzellen besiedelten BioVaSc behandelt wurde. Ein Anschluss an das Gefäßsystem fand nicht statt, sondern die Blutversorgung wurde über das Aufnähen von umliegendem Gewebe sichergestellt. Der Patient konnte bis zu einem Rezidiv zu seinem gewohnten Leben zurückkehren [51]. Der zweite Patient ist mit einer an das Blutsystem angeschlossenen BioVaSc therapiert worden. Diese wurde hierzu zunächst mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes sowie Skelettmuskelzellen und Fibroblasten [79] besiedelt und in einem Bioreaktorsystem kultiviert, im Anschluss in den Unterarm eingesetzt und an das Gefäßsystem angeschlossen. Nach einer Woche ist das autolog besiedelte Implantat entnommen und analysiert worden [79]. Nach dem dies erfolgreich gelang erfolgte der eigentliche Verschluss des trachealen Defekts mit einem ebenso aufgebauten Implantat. Der dritte Patient wurde mit einem Patch aus einer mit Endothelzellen und Skelettmuskelzellen besiedelten BioVaSc versorgt. Dieses war für 2 Wochen in kultiviert worden und zeigte gutes einheilen ohne schwere Abstoßungsreaktionen. Keiner der so behandelten Patienten benötigte Immunsuppressiva. Die Patienten starben nach erfolgreicher Behandlung an den Folgen ihrer Grunderkrankung.

Die in dieser Arbeit verwendete BioVaSc ermöglicht die Anastomose an das Blutgefäßsystem des Patienten. Sie besteht aus porcinem Jejunum welches mit einem arteriellem Zufluss und venösen Abfluss präpariert wird. Nach der chemischen Dezellularisierung bleibt das Kollagengerüst zurück und bietet so die Möglichkeit der Co-Kultur verschiedener Zelltypen. Die Gefäßstrukturen werden mit mikrovaskulären Endothelzellen besiedelt. Die Scherkräfte, die *in vivo* auf diese einwirken, können durch den pulsatilem Medienfluss während der Kultur im Bioreaktorsystem simuliert werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die durch das Blut hervorgerufenen Scherkräfte durch die enthaltenen zellulären Bestandteile, wie beispielsweise die Erythrozyten, höher sind als die *in vitro* vom Zellkulturmedium hervorgerufenen. Die Muskelzellen und Fibroblasten werden ohne mechanische Belastung in das Lumen des Darms gegeben und dort durch Diffusion versorgt. Sie sollen dabei die mechanische Stabilität erhöhen, das einheilen beschleunigen und den mikrobiellen

Bewuchs minimieren. Bei der Co-Kultur verschiedener Zelltypen stellt sich immer das Problem des geeigneten Mediums, da jeder Zelltyp eigene Ansprüche an die Kulturbedingungen aufweist. Da die vollständige Rebesiedlung des Gefäßsystems die größte Herausforderung darstellte, wurde das hierfür optimierte Medium verwendet. Die Proliferation der Fibroblasten und Muskelzellen war auch im verwendeten Endothelzellmedium nachweisbar. Hierbei ist eine Differenzierung zwischen diesen beiden Zelltypen innerhalb der BioVaSc allerdings unmöglich. Da die Muskelzellen aus Satellitenzellen hervorgehen, sind sie in unterschiedlichsten Differenzierungsstadien und viele der verwendeten Antikörper färben nur einen Teil der Kultur an. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kulturen keine reinen Muskelzellkulturen sondern auch mit Fremdzellen, wie beispielsweise Fibroblasten, versetzt waren und mit keinem der getesteten Muskelzellmarker eine 100% positive Färbung erreichten. Auch für die Fibroblasten konnte kein idealer Marker gefunden werden. Somit konnte die gemischte Zellkultur nach Besiedlung des Lumens nicht mehr differenziert werden. Damit konnte nicht geklärt werden in welcher Masse die beiden Zelltypen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten innerhalb der Matrix aufweisen. Im Anschluss an diese Arbeit soll mit Hilfe einer RT-PCR die Besiedlung des Lumens quantifiziert werden. Dies wird dadurch ermöglicht, dass die Muskelzellen in der Regel von männlichen Spendern und die Fibroblasten und Endothelzellen von weiblichen Spendern stammen. Somit kann die Unterscheidung der Zellen über die Analyse der Geschlechtschromosomen erfolgen.

Die natürlicherweise enthaltenen Blutgefäßstrukturen innerhalb der BioVaSc könnten auch *in vivo* die Ernährung der autologen Zellen sicherstellen. Im Verlauf dieser Arbeit konnte die Besiedlungsdichte mit mikrovaskulären Endothelzellen erhöht werden, allerdings zeigten die Durchflussmessungen am fertigen Implantat einen wesentlich geringeren Durchfluss als die vor der Azellularisierung durchgeführten Messungen. Wenn überhaupt tritt nur ein kleiner Teil des infundierten PBS aus der Vene wieder aus. Der Großteil diffundiert gleichmäßig über die Matrix, eine Bevorzugung des Lumens war dabei nicht sichtbar. Teilweise war das Gefäßsystem des autolog besiedelten Implantats nach zweiwöchiger Kultur verstopft und ein Zulauf von Medium konnte nicht mehr beobachtet werden, auch wenn diese Matrices vor der Besiedlung bei der Testung mit Phenolrot eine gute Durchlässigkeit zeigten. Der nicht vorhandene Rückfluss könnte durch eine nicht ausreichende

Endothelialisierung und somit undichtes Gefäßsystem entstehen. Im Gegensatz dazu könnte die Verstopfung durch ein starkes Wachstum der Endothelzellen ausgelöst werden. Dies könnte durch die fehlende Ko-Kultur mit den *in vivo* vorzufindenden Zellen, wie beispielsweise Pericyten, und den damit nicht vorhandenen Signalen zum kontrollierten Wachstum zusammenhängen. Auch eine Überstimulation durch das Zellkulturmedium kommt in Betracht, da es auf eine verstärkte Proliferation ausgelegt ist. Ein Herauslösen von einem Konglomerat aus Fibroblasten und Muskelzellen ist nicht wahrscheinlich, da die Pumpe große Scherkräfte erzeugt und die Zellen deswegen beim Passieren zerstören würde. Da im Moment noch nicht geklärt ist, ob es in der zweiwöchigen Kulturphase zum Verstopfen der Gefäßäste kommt, ist es im weiteren Verlauf notwendig, eine Inprozesskontrolle zum Versorgungsstadium der BioVaSc zu etablieren. Hierzu könnte der Fluidstrom in die Matrix bestimmt werden. Im Moment ist dieser zwar druckkontrolliert allerdings wird nicht ermittelt wie viel Medium dabei in die Matrix fließt. Dies kann bei einer Blockade zu fehlendem Scherstress der Endothelzellen führen und die ausreichende Versorgung der Zellen gefährden. Die Fibroblasten und Skelettmuskelzellen kleideten auch bei verstopftem Gefäßsystem das Darmlumen aus. Idealerweise sollte in Zukunft auch schon die verwendete Zellsuspension mit einem unter GMP erlaubten, nicht zelltoxischen und intensiven Farbstoff angefärbt werden, damit ein Verlegen der Arterie oder Vene frühzeitig erkannt wird und eingegriffen werden kann. Schon kleine Veränderungen in der Lage der Arterie oder Vene können sehr große Unterschiede beim Fluidstrom in die BioVaSc auslösen. In wie weit das nach der Anastomose an das Blutgefäßsystem zu Problemen führt, muss sich im Tierversuch oder in der ersten Phase der klinischen Studie zeigen, da *in vitro* nicht bestimmt werden kann, wie viel Rückfluss für ein gutes Einheilen notwendig ist. Auch Tests mit FCS, welches eine wesentlich höhere Dichte als PBS oder Zellkulturmedium aufweist, zeigten nach zweiwöchiger Kultur keinen höheren Durchfluss.

Je nach Krankheitsbild kommt auch der Einsatz als vaskularisierter Patch ohne Anastomose in Frage. Hierbei wird die Versorgung der Zellen durch das Aufnähen von Muskelgewebe und die Einsproßung von Blutgefäßen sichergestellt. Durch die zuvor eingebrachten mikrovaskulären Endothelzellen könnte es zu verstärkter Angiogenese kommen, da diese schlechter mit Sauerstoff versorgt werden und durch diesen Stimulus verschiedenste Wachstumsfaktoren aussenden [156, 157]. Diese

Daten lassen sich *in vitro* nicht ermitteln und können erst in der Klinik erhoben werden.

Für die Freigabe an die Klinik wird ein Assay benötigt, um die Sicherheit und Funktionalität des Implantats zu gewährleisten. Die meisten Analysen sind invasiv und mit der Zerstörung des autologen Implantates verbunden und können nur in der Validierungsphase angewendet werden. Histologische Analysen können nur retrospektiv erfolgen. Mit Hilfe des MTT-Testes ist es möglich innerhalb einer Stunde die Besiedlung des Lumens, allerdings nicht des Gefäßsystems, nachzuweisen. Dies könnte noch während dem Transport in die Klinik, an einem kleinen Teilabschnitt vom Rand geschehen. Die Etablierung eines nicht invasiven Tests für das Endprodukt wäre ein wichtiger Schritt für die Beurteilung der Produktqualität. Auch die Kontrolle des Produkts während des Kulturverlaufs ist nicht einfach. Die Methoden müssen zu diesem Zeitpunkt nicht invasiv sein, da es ansonsten zur Zerstörung des besiedelten Implantats kommen kann. Die Entnahme von Medienproben während der Kultur war stark verfälscht, da die Zellen sowohl in den Silikonschläuchen als auch auf den Glasböden des Reaktors und der Flaschen wuchsen und somit keinerlei Rückschlüsse auf die Zellen in der BioVaSc möglich war. Ansonsten wäre die Analyse von Glukose oder Laktat ein guter Marker zur Kontrolle der Zellaktivität während der Kultur im Bioreaktor gewesen. Die in Zukunft verwendeten Reaktoren sollten aus einem Material bestehen, welches nicht von den Zellen bewachsen werden kann und somit die Kontrolle über die Kulturzeit erlaubt.

5.4 Reaktortechnologie

Für verschiedenste Zelltypen ist beschrieben worden, dass sie unter den Bedingungen der konventionellen Zellkultur innerhalb kürzester Zeit ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften ändern und ihren Stoffwechsel umstellen [106, 158]. Neue Ansätze versuchen der Dedifferenzierung durch physiologischere Kulturbedingungen entgegenzuwirken. In dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt mit einer geeigneten dreidimensionalen Matrix und den optimalen Kulturbedingungen die Zellen möglichst physiologisch zu kultivieren und dadurch auch zu stimulieren. Hierbei werden mit Hilfe modernster Reaktortechnik, die in den Blutgefäßen herrschenden Strömungsverhältnisse für die mikrovaskulären Endothelzellen simuliert. Der Einfluss der Strömung auf Endothelzellen oder deren Vorläufer wird in der Literatur schon seit vielen Jahren beschrieben [159-162]. Die

Muskelzellen und Fibroblasten werden ohne mechanische Stimulation direkt im Lumen der BioVaSc kultiviert, da sie im Körper auch keinen direkten Fluidströmen ausgesetzt sind.

Der Aufbau von solch komplexen Zell-Matrix-Konstrukten ist nur bei einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen, zellspezifischen Reizen und einer zuverlässigen Überwachung möglich [163]. Das lässt sich mit den Standardmethoden der Zellkultur nur bedingt umsetzen und benötigt die Entwicklung spezieller Reaktorsysteme [164]. Bei der Auswahl und Konstruktion von solchen Reaktoren spielt der Maßstab, das Strömungsfeld, die Misch- und Verweilzeiten, die Sauerstoffverteilung und der Scherstress eine große Rolle. Die Eigenschaften des Gewebes und dessen Funktionalität hängen maßgeblich von den erzeugten mechanischen, strömungsdynamischen und auch biochemischen Bedingungen ab [97, 165, 166]. In diesem Fall erzeugen peristaltische Pumpen den benötigten pulsartigen Fluidstrom.

Im Rahmen des GMP aber auch in der Standardzellkultur liegt ein besonderes Augenmerk auf der Vermeidung von Kontaminationen durch ein dicht abschließendes System. Das hier verwendete Reaktorsystem ist ein geschlossenes System, das über einen sterilen Luftfilter mit der Atmosphäre im Inkubatorwagen (37°C, 5% CO₂) im Austausch steht. Manipulationen erfolgen nur unter der Sterilbank. Hierbei ist die Sterilität umso einfacher zu gewährleisten, je unkomplizierter der Aufbau des Reaktors ist. Der in dieser Arbeit verwendete Glasreaktor wurde deshalb im Hinblick auf die Einsparungen von Schlauchverbindungen weiter entwickelt. Der Prototyp aus Polyetheretherketon (PEEK) ist standfester und einfacher zu handhaben, was die Gefahr von Kontaminationen verringert. Zusätzlich sind die verbliebenen Schlauchlängen genau vorgegeben und somit standardisiert. Eine GMP-gerechte Reinigungsvalidierung ist in beiden Fällen durchzuführen, wobei insbesondere auf die Oberflächen und Kanten sowie die Verbindungen zu achten ist. Als Endpunkt der Entwicklung ist ein Einmalreaktor im Spritzgussverfahren aus Polystyrol nach Vorbild des gezeigten PEEK-Reaktors anzustreben, da der Preis für PEEK um ein vielfaches höher ist als der für Polystyrol. Hierbei soll vollständig auf Schläuche verzichtet und anstatt dessen schon im Reaktor enthaltene Kanäle das Medium zwischen den Flaschen und in die Bioreaktorkammer führen. Diese wären günstig herzustellen und als

Einmalartikel verwendbar. Unter GMP-Bedingungen wäre die Verwendung von Einmalreaktoren zu bevorzugen. Die Vorteile von Einwegartikeln liegen in ihrer leichten Handhabbarkeit, der reduzierten Kreuzkontaminationsgefahr zwischen zwei Patienten und der Kosten bzw. Zeitersparnis bei der Reinigung [167]. Die Nachteile sind die bei manchen Kunststoffen noch fehlende Langzeiterfahrung und natürlich der Zunahme für Kosten der Abfallbeseitigung und Verbrauchsmaterial. Unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis spielen diese allerdings eine eher untergeordnete Rolle. Stark diskutiert wird hierbei auch das Herauslösen von Lechables oder auch Extractables aus dem Material [167] und die möglichen Wechselwirkungen mit dem Implantat. Im Verlaufe dieser Arbeit ist mit Mehrwegmaterial gearbeitet worden. Für den Einsatz am Patienten muss dies vermieden werden.

Der Inkubatorwagen bietet den Bioreaktoren eine temperierte Umgebung und kontrolliert gleichzeitig die Atmosphäre in Bezug auf das eingeleitete Kohlendioxid-Gas. Durch den zusätzlichen Einbau verschiedener Geräte wie beispielsweise Pumpen kann er an die für die jeweiligen Zelltypen notwendigen Bedingungen angepasst werden. Mit normalen Standardinkubatoren ist dies nicht möglich. Mit steigender Komplexität nimmt auch die Anzahl der zu kontrollierenden Parameter zu. In den meisten Fällen ist eine Regelung der einzelnen Prozessgrößen erforderlich, da eine Steuerung die ständig auftretenden Störungen nicht ausgleichen kann [163]. Trotz der Komplexität der Systeme, sollte dabei die Oberfläche für den Anwender möglichst einfach bedienbar sein [97]. Das ist unter den Bedingungen des GMP besonders wichtig, da Fehler Konsequenzen für den Patienten haben. Eine einfach strukturierte Benutzeroberfläche hilft somit bei der Erhöhung der Sicherheit. In diesem Fall ist das Programm so konstruiert, dass ein Eingreifen nach dem Startvorgang nicht mehr notwendig ist. Das Programm regelt und dokumentiert die Parameter automatisch. Dabei wird die Temperatur zwischen 36,5°C und 37,5°C gehalten und bietet somit optimale Wachstumsbedingungen. Der CO₂-Gehalt wird auf 5% reguliert. Nach Öffnen der Kammer kommt es zunächst zu einem Abfall des CO₂-Gehalts. Dieser wird innerhalb von 15 Minuten wieder ausgeglichen, wobei die Regelung den CO₂-Gehalts degressiv steigert, um ein überschießen zu vermeiden. Zusätzlich dazu spielt die Reinigung und Desinfektion der Oberflächen des Inkubators im GMP eine große Rolle. Während es beim ersten Wagen noch

überstehende Schrauben, tiefe und schwer zu reinigende Ecken und Kanten gab, ist dieses beim zweiten Wagen weiter optimiert worden.

Ein weiterer Punkt, welcher bei der Konstruktion von Reaktoren beachtet werden muss, ist die Limitation der Nährstoffversorgung mittels Diffusion. *In vivo* erfolgt die Versorgung der Zellen über Blutgefäßstrukturen, wobei die Nährstoffe und der Sauerstoff bzw. die Abfallprodukte im Gewebe nur kurze Strecken zurücklegen. Den meisten *in vitro* hergestellten Konstrukten fehlt diese Versorgung, was zu Problemen wie beispielsweise dem Absterben des Transplantats führen kann [168]. Vaskularisierte Gewebekonstrukte benötigen ein speziell angefertigtes Bioreaktorsystem, welches die Perfusion der Matrix ermöglicht [2, 169]. Bei der manuellen Herstellung ist eine permanente Überwachung oft nicht möglich, die Prozesskontrolle kann also durch den Einbau von Sensoren, wie z.B. zur Überwachung des Glukoseverbrauchs, gesteigert werden. In diesem Fall hätte dies die Ergebnisse verfälscht, da die Zellen nicht nur innerhalb der BioVaSc sondern auch auf dem Glasboden des Reaktors und der Flaschen sowie in den Schläuchen und Verbindungsstücken wuchsen. Im Extremfall hätte somit keine Zelle in der BioVaSc adhärirt sein können und die im Reaktorsystem anheftenden Zellen hätten den Sensoren ein gutes Wachstum vorgetäuscht. Bei der zukünftigen Entwicklung der Reaktoren sollte deshalb auf eine Beschichtung geachtet werden, welche das Anheften der Zellen verhindert ohne sich dabei im Zellkulturmedium zu lösen.

Im Bereich der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Zellen kann man mit der mathematischen Modellierung mit Hilfe von Vergleichsdaten Erkenntnisse über die Versorgung oder Stimulation der Zellen gewinnen. Die Fragestellung muss davor allerdings genau definiert sein. Dabei ist die Parametrierung der entwickelten Modelle ein kritischer Faktor [163]. Durch den komplexen Aufbau und auch die fehlende Homogenität müssen einzelne Parameter dann doch wieder experimentell bestimmt werden. Allerdings ist sie oft die einzige Möglichkeit die Versorgung großer Gewebe abzuschätzen.

5.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden vier Teilabschnitte behandelt. Der erste war die Optimierung der Azellularisierung unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis (good manufacturing practise = GMP). Diese ist dabei soweit optimiert worden, dass eine

nahezu komplette Zell- und DNS-Freiheit in der Histologie nachweisbar war. In der quantitativen Analyse ergab sich eine Abreicherung auf 2% der nativen DNS. Zur Degradation der Rest-DNS konnten hierbei Enzyme eingesetzt werden, die für die Produktion von ATMPs zugelassen sind. Der Endotoxingehalt war unter den vorgeschriebenen Grenzwert absenkbar. Zur Testung der Stabilität sind Reißtests durchgeführt worden. Hierbei zeigte sich erst ab 60°C eine starke Degradation des Kollagens. Eine Lagerung bei 4°C hatte im getesteten Zeitraum keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der Matrix. Somit kann bei einer festgelegten Haltbarkeit von drei Monaten von keiner Degradation der Matrix ausgegangen werden.

In den nachfolgende Tabelle 21 ist der aufgebaute GMP Prozess der Matrix Herstellung mit der benötigten Zeit, erarbeiteten Dokumentation, Spezifikation und den erstellten SOP's (**S**tandard **O**peration **P**rocedure) zusammengefasst.

Tabelle 21: Prozessschema der Matrix Herstellung

<u>Herstellung der Matrix</u>				
Prozessschritt	Zeit	Dokumentation	Spezifikation	Erstellte SOP
Bestellung Schwein	-3 Tage	Zertifikat	Rasse, Gewicht, Haltung, Geschlecht, SPF Status (Zertifikat)	
Präparation der Darmsegmente	Tag 0	Herstellprotokoll	Lage, Länge (mindestens 14 cm), Rückfluss (50%)	Entnahme
Transport	Tag 0	Frachtschein, Etiketten, Unbedenklichkeits-erklärung,	Temperatur (4-12°C)	Transport
Start Produktion	Tag 0	Eingangskontrolle	Frachtschein, Etiketten, Unbedenklichkeits-erklärung, Temperatur, Ergebnis vom Funktionstest	Eingangskontrolle, Auftrag
Azellularisierung	Tag 0	Herstellungsprotokoll	Optische Kontrolle (durchscheinend weiß), Durchgängigkeit	Herstellung der BioVaSc
Waschschritte	Tag 0-4	Herstellungsprotokoll, Protokoll der Qualitätskontrolle	Gallsäurefreiheit (< 10 µmol/l)	Herstellung der BioVaSc
Sterilisation	Tag 4-5	Bericht	steril, Endotoxingehalt	
Nachfolgende Analysen	ab Tag 8	Protokoll der Qualitätskontrolle, Bericht	Histologie: Feulgen (qualitative DNS Freiheit), H&E Validierung: Stabilität, quantitative DNS-Freiheit, Charakterisierung der Matrix	Gallsäuretest, Histologie, H&E Färbung, Feulgen Reaktion

Der zweite Teilabschnitt ist die Isolierung und Charakterisierung der Zellen. Die Isolation der Fibroblasten, Skelettmuskelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen konnte optimiert und die Zellen charakterisiert werden.

Das Prozessschema zum Teilabschnitt des entwickelten GMP Prozesses ist in Tabelle 22 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 22: Prozessschema zur Isolation und Kultur der Zellen

Isolation und Kultivierung der autologen Zellen				
Prozessschritt	Zeit	Dokumentation	Spezifikation	Erstellte SOP
Auftragserteilung	2-3 Tage vor Prozessbeginn	Auftrag, Serologie, interner Auftrag	HIV I/II, Hepatitis B und C, Syphilis (Serologie)	
Biopsieentnahme	Tag 0	Patienteneinwilligung, Patienteneignung, Entnahmeprotokoll	Mindestgröße (8 cm ²), Gesundheitsstatus	Biopsieentnahme
Transport	Tag 0	Frachtschein, Etiketten, Unbedenklichkeitserklärung, Temperatur		Transport
Start Produktion	Tag 0	Eingangskontrolle	Temperatur (4-8°C), Transportbehälter dicht, Visuelle Kontrolle, vollständige Dokumente	Eingangskontrolle
Isolierung der Zellen	Tag 0	Herstellprotokoll der einzelnen Zellen, Protokoll der Qualitätskontrolle Berichte Sterilität, Endotoxin, Mycoplasmen, Endotoxin Vitalität, Zellzahl	Sterilität, Endotoxin, Mycoplasmen, Vitalität, Zellzahl (mindestens 100.000 Endothelzellen)	Isolation und Kultivierung: Endothelzellen, Muskelzellen, Fibroblasten Zellzahl und Vitalität Immunhistologische Charakterisierung
Expansion der Zellen	Tag 1-35	Herstellprotokoll, Protokoll der Qualitätskontrolle	Zellzahl, Vitalität, Sterilität, Identität	Isolation und Kultivierung: Endothelzellen, Muskelzellen, Fibroblasten Immunhistologische Charakterisierung
Zellernte Endothelzellen	Tag 28+29	Herstellprotokoll, Protokoll der Qualitätskontrolle	Zellzahl (mindestens 20 Millionen) Vitalität, Sterilität, Mycoplasmen, Endotoxin, Identität, Passage	Isolation und Kultivierung: Endothelzellen, Immunhistologische Charakterisierung
Zellernte Muskelzellen, Fibroblasten	Tag 35	Herstellprotokoll, Protokoll der Qualitätskontrolle	Zellzahl (mindestens 10 Millionen Zellen), Vitalität, Sterilität, Mycoplasmen, Endotoxin, Identität	Isolation und Kultivierung Fibroblasten, Muskelzellen Immunhistologische Charakterisierung
Nachfolgende Analysen	ab Tag 28 bzw. 35	Protokoll der Qualitätskontrolle, Bericht	Sterilität, Validierung: Karyotypisierung	

Der dritte Abschnitt ist die Besiedlung der BioVaSc mit primären Zellen zur Herstellung des autologen Implantats. Hierbei konnte die Besiedlungseffizienz erhöht werden. Die Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen in der BioVaSc war möglich, die Unterscheidung zwischen Skelettmuskelzellen und Fibroblasten war auf Grund des frühen Differenzierungsstands nicht mit immunhistochemischen Methoden darstellbar. Mit Hilfe von MTT konnte die Vitalität der Zellen nachgewiesen werden. Der Teilabschnitt dieses Prozesses ist in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Prozessschema zur Besiedlung und Kultur des autologen Implantats

Besiedlung und Kultur der autologen Implantats				
Prozessschritt	Zeit	Dokumentation	Spezifikation	Erstellte SOPs
Besiedlung: Endothelzellen	Tag 28+29	Herstellprotokoll	Zellzahl, Vitalität (mindestens 20 Millionen Zellen)	Besiedlung und Kultur der BioVaSc
Besiedlung: Fibroblasten, Muskelzellen	Tag 35	Herstellprotokoll	Zellzahl, Vitalität (mindestens 10 Millionen Zellen)	Besiedlung und Kultur der BioVaSc
Dynamische Kultur	Tag 28- 42	Herstellprotokoll	Sterilität	Besiedlung und Kultur der BioVaSc
Ernte	Tag 42	Herstellprotokoll	Sterilität, Endotoxin, Mycoplasmen, Druckkontrolle (im Durchschnitt zwischen 70-130 mmHg), Durchfluss	Besiedlung und Kultur der BioVaSc
Freigabe	Tag	Freigabeprotokoll, Freigabezertifikat	MTT (Lumen besiedelt)	Analyse der Vitalität durch MTT,
Transport	42	Frachtschein, Etiketten, Unbedenklichkeitser- klärung, Temperatur	Temperatur (4-8°C)	Verpackung und Transport
OP	Beginn Tag 42	Bericht		Implantation
Nachfolgende Analysen	ab Tag 43	Protokoll der Qualitätskontrolle	Histologie, Sterilität	Immunhistologie auf Paraffin- schnitten

Der vierte Abschnitt ist die Weiterentwicklung der Reaktortechnik. Die ursprünglich etablierte Technik wurde an die Bedingungen der guten Herstellungspraxis angepasst. Hierzu werden die Daten, wie CO₂, Temperatur und Druckverlauf, im Hintergrund erfasst und dokumentiert. Die einfache Reinigung und Desinfektion wurde bei der Konstruktion berücksichtigt.

5.6 Ausblick

Der nächste Meilenstein zum verwendbaren, autologen Implantat ist das Erreichen der Herstellerlaubnis. Hierzu müssen die gesamten erstellten Daten gebündelt und dem Regierungspräsidium sowie dem Paul-Ehrlich Institut vorgelegt werden. Wichtig sind davor noch Experimente zur Klärung des Durchflusses und gegebenenfalls eine Optimierung der Besiedlung. Auch die Unterscheidung von Fibroblasten und Skelettmuskelzellen im autologen Transplant sind wichtig. Zusätzlich können noch Daten zur Virussicherheit notwendig sein. Nach ausführlicher Beratung mit den Behörden und Umsetzung der noch notwendigen Experimente, ist das nächste Ziel eine klinische Studie mit fünf Patienten, welche an der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen durchgeführt wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Lantz, G.C., et al., *Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review*. J Invest Surg, 1993. **6**(3): p. 297-310.
2. Walles, T., et al., *Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival*. Biomaterials, 2003. **24**(7): p. 1233-9.
3. Atala, A., *Tissue engineering of human bladder*. Br Med Bull, 2011. **97**: p. 81-104.
4. Yamada, S. and I. Kojima, *Regenerative medicine of the pancreatic beta cells*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005. **12**(3): p. 218-26.
5. Hata, T., et al., *Transplantation of Engineered Chimeric Liver With Autologous Hepatocytes and Xenobiotic Scaffold*. Ann Surg, 2012.
6. Basu, J. and J.W. Ludlow, *Developmental engineering the kidney: leveraging principles of morphogenesis for renal regeneration*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2012. **96**(1): p. 30-8.
7. Rippel, R.A., H. Ghanbari, and A.M. Seifalian, *Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery*. World J Surg, 2012. **36**(7): p. 1581-91.
8. Martinez-Santamaria, L., S. Guerrero-Aspizua, and M. Del Rio, *Skin bioengineering: preclinical and clinical applications*. Actas Dermosifiliogr, 2012. **103**(1): p. 5-11.
9. Asai, J., et al., *Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice*. Int Wound J, 2012.
10. Ai, J., et al., *Tissue engineering using human mineralized bone xenograft and bone marrow mesenchymal stem cells allograft in healing of tibial fracture of experimental rabbit model*. Iran Red Crescent Med J, 2012. **14**(2): p. 96-103.
11. Rohen, J.W., *Funktionelle Anatomie des Menschen*. Schattauer Verlag 1994. **8 Auflage** (ISBN 3-7945-1670-2).
12. Grillo, H.C., *Development of tracheal surgery: a historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(3): p. 1039-47.
13. Grillo, H.C., *Tracheal replacement: a critical review*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(6): p. 1995-2004.
14. Berghaus, A.R., G.; Böhme G., *Hals-Nasen-Ohren Heilkunde*. Duale Reihe, Hippokrates Verlag, 1996. **ISBN 3-7773-0944-3**.
15. Grillo, H.C., *Surgery of the trachea*. Curr Probl Surg, 1970: p. 3-59.
16. Grillo, H.C., *Notes on the windpipe*. Ann Thorac Surg, 1989. **47**(1): p. 9-26.
17. Glück, T., A. Zeller, *Die prophylaktische Resektion der Trachea*. Arch Klin Chir., 1881. **26**: p. 427-36.
18. Nowakowski, K., *Beitrag zur Tracheoplastik*. Arch klein Chir., 1909. **90**: p. 847-861.
19. LEVIT, H., *Deckung von Trachealdefekten durch eine freie Plastik aus der Fascia lata femoris*. Arch klin Chir., 1912. **97**: p. 686-699.
20. Conley, J.J., *Reconstruction of the subglottic air passage*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1953. **62**(2): p. 477-95.
21. Kay, E.B., *Tracheal resection with primary anastomosis*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1951. **60**(3): p. 864-70.

22. Sweet, R.H., *Esophageal hiatus hernia of the diaphragm; the anatomical characteristics, technic of repair, and results of treatment in 111 consecutive cases*. Ann Surg, 1952. **135**(1): p. 1-13.
23. Michelson, E., et al., *Experiments in tracheal reconstruction*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1961. **41**: p. 748-59.
24. Grillo, H.C., E.F. Dignan, and T. Miura, *Extensive Resection and Reconstruction of Mediastinal Trachea without Prosthesis or Graft: An Anatomical Study in Man*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1964. **48**: p. 741-9.
25. Belsey, R., *Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea*. Br J Surg, 1950. **38**(150): p. 200-5.
26. Jackson, T.L., et al., *The experimental use of homogenous tracheal transplants in the restoration of continuity of the tracheobronchial tree*. J Thorac Surg, 1950. **20**(4): p. 598-612; passim.
27. Scherer, M.A., et al., *Experimental bioprosthetic reconstruction of the trachea*. Arch Otorhinolaryngol, 1986. **243**(4): p. 215-23.
28. Olze, H., O. Kaschke, and W.D. Muller, *Improving the design of an alloplastic epithelialized tracheal prosthesis*. HNO, 1997. **45**(6): p. 453-9.
29. Delaere, P.R., et al., *Use of a composite fascial carrier for laryngotracheal reconstruction*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1997. **106**(3): p. 175-81.
30. Messineo, A., et al., *Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap*. J Pediatr Surg, 1991. **26**(11): p. 1296-300.
31. Villegas-Cabello, O., et al., *Staged replacement of the canine trachea with ringed polyethylene terephthalate grafts*. Thorac Cardiovasc Surg, 1994. **42**(5): p. 302-5.
32. Salassa, J.R., B.W. Pearson, and W.S. Payne, *Gross and microscopical blood supply of the trachea*. Ann Thorac Surg, 1977. **24**(2): p. 100-7.
33. Daniel, R.A., Jr., *The regeneration of defects of the trachea and bronchi; an experimental study*. J Thorac Surg, 1948. **17**(3): p. 335-49.
34. Wykoff, T.W., *A preliminary report on segmental tracheal prosthetic replacement in dogs*. Laryngoscope, 1973. **83**(7): p. 1072-7.
35. Beattie, E.J., Jr., B. Blades, and J.M. Keshishian, *Tracheal reconstruction*. J Thorac Surg, 1956. **32**(6): p. 707-25; discussion, 725-7.
36. Shaw, R.R., A. Aslami, and W.R. Webb, *Circumferential replacement of the trachea in experimental animals*. Ann Thorac Surg, 1968. **5**(1): p. 30-5.
37. Borrie, J., N.R. Redshaw, and T.L. Dobbinson, *Silastic tracheal bifurcation prosthesis with subterminal dacron suture cuffs*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1973. **65**(6): p. 956-62.
38. Demos, N.J., et al., *Tracheal regeneration in long-term survivors with silicone prosthesis*. Ann Thorac Surg, 1973. **16**(3): p. 293-300.
39. Kramish, D. and H.M. Morfit, *The Use of a Teflon Prosthesis to Bridge Complete Sleeve Defects in the Human Trachea*. Am J Surg, 1963. **106**: p. 704-8.
40. Bailey, B.J. and J. Kosoy, *Observations in the development of tracheal prostheses and tracheal transplantation*. Laryngoscope, 1970. **80**(10): p. 1553-65.
41. Cull, D.L., et al., *Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs*. Ann Thorac Surg, 1990. **50**(6): p. 899-901.
42. Jacobs, J.R., *Investigations into tracheal prosthetic reconstruction*. Laryngoscope, 1988. **98**(11): p. 1239-45.

43. Bucher, R.M., W.E. Burnett, and G.P. Rosemond, *Experimental reconstruction of tracheal and bronchial defects with stainless steel wire mesh*. J Thorac Surg, 1951. **21**(6): p. 572-83.
44. Greenberg, S.D. and R.K. Willms, *Regeneration of respiratory epithelium. An experimental study in dogs*. Arch Pathol, 1962. **73**: p. 53-8.
45. Poticha, S.M. and F.J. Lewis, *Experimental replacement of the trachea*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1966. **52**(1): p. 61-7.
46. Grillo, H.C., *Tracheal replacement*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **125**(4): p. 975.
47. Balderman, S.C. and G. Weinblatt, *Tracheal autograft revascularization*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **94**(3): p. 434-41.
48. Penton, R.S. and O.C. Brantigan, *The use of a viable pedicle graft for repairing an extensive tracheobronchial defect*. Ann Surg, 1952. **135**(5): p. 709-14.
49. Watson, J., et al., *Composite vascularized free-rib and pleural transfer for laryngotracheal reconstruction*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1983. **91**(4): p. 384-95.
50. Okumura, N., et al., *Experimental reconstruction of the intrathoracic trachea using a new prosthesis made from collagen grafted mesh*. ASAIO J, 1994. **40**(3): p. M834-9.
51. Macchiarini, P., et al., *First human transplantation of a bioengineered airway tissue*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **128**(4): p. 638-41.
52. Wurtz, A., et al., *Tracheal replacement with aortic allografts*. N Engl J Med, 2006. **355**(18): p. 1938-40.
53. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-30.
54. Jungebluth, P., et al., *Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study*. Lancet, 2011. **378**(9808): p. 1997-2004.
55. Elliott, M.J., et al., *Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study*. Lancet, 2012.
56. Stock, U.A. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: current state and prospects*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 443-51.
57. Chen, C., et al., *Phosphorylcholine coating of ePTFE grafts reduces neointimal hyperplasia in canine model*. Ann Vasc Surg, 1997. **11**(1): p. 74-9.
58. Bonzani, I.C., J.H. George, and M.M. Stevens, *Novel materials for bone and cartilage regeneration*. Curr Opin Chem Biol, 2006. **10**(6): p. 568-75.
59. Naderi, H., M.M. Matin, and A.R. Bahrami, *Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems*. J Biomater Appl, 2011. **26**(4): p. 383-417.
60. Hodde, J., *Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration*. Tissue Eng, 2002. **8**(2): p. 295-308.
61. Chubinskaya, S., et al., *Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(10): p. 1211-20.
62. Schulz, R.M., et al., *Cartilage tissue engineering by collagen matrix associated bone marrow derived mesenchymal stem cells*. Biomed Mater Eng, 2008. **18**(1 Suppl): p. S55-70.
63. Gilbert, T.W., *Strategies for tissue and organ decellularization*. J Cell Biochem, 2012. **113**(7): p. 2217-22.

64. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1201-11.
65. Rosario, D.J., et al., *Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract*. Regen Med, 2008. **3**(2): p. 145-56.
66. Wainwright, D.J., *Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns*. Burns, 1995. **21**(4): p. 243-8.
67. Petersen, T.H., et al., *Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds*. Cells Tissues Organs, 2012. **195**(3): p. 222-31.
68. Dainese, L., et al., *Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells*. J Heart Valve Dis, 2012. **21**(1): p. 125-34.
69. Teebken, O.E., et al., *Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2003. **25**(4): p. 305-12.
70. Nakayama, K.H., et al., *Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(7): p. 2207-16.
71. Totonelli, G., et al., *A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration*. Biomaterials, 2012. **33**(12): p. 3401-10.
72. Baiguera, S., et al., *Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation*. Biomaterials, 2010. **31**(34): p. 8931-8.
73. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
74. Jain, R.K., et al., *Engineering vascularized tissue*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): p. 821-3.
75. Schultheiss, D., et al., *Biological vascularized matrix (BioVaM): a new method for solving the perfusion problems in tissue engineering*. Urologe A, 2004. **43**(10): p. 1223-8.
76. Linke, K., et al., *Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research*. Tissue Eng, 2007. **13**(11): p. 2699-707.
77. Mertsching, H., et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6610-7.
78. Schanz, J., et al., *Experimental tracheal patching using extracellular matrix scaffolds*. Ann Thorac Surg, 2009. **87**(4): p. 1321-2; author reply 1322-3.
79. Mertsching, H., et al., *Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue*. Transplantation, 2009. **88**(2): p. 203-10.
80. Walles, T., et al., *Tissue remodeling in a bioartificial fibromuscular patch following transplantation in a human*. Transplantation, 2005. **80**(2): p. 284-5.
81. Schultheiss, D., et al., *Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model*. J Urol, 2005. **173**(1): p. 276-80.
82. Badylak, S., et al., *Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold*. Biomaterials, 1999. **20**(23-24): p. 2257-63.
83. Voytik-Harbin, S.L., et al., *Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa*. J Cell Biochem, 1997. **67**(4): p. 478-91.
84. Olson, J.L., A. Atala, and J.J. Yoo, *Tissue engineering: current strategies and future directions*. Chonnam Med J, 2011. **47**(1): p. 1-13.

85. Amiel, G.E., et al., *Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2355-65.
86. Auchincloss, H., Jr. and D.H. Sachs, *Xenogeneic transplantation*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 433-70.
87. Votteler, M., et al., *Stem cell microenvironments--unveiling the secret of how stem cell fate is defined*. Macromol Biosci, 2010. **10**(11): p. 1302-15.
88. Brignier, A.C. and A.M. Gewirtz, *Embryonic and adult stem cell therapy*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S336-44.
89. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
90. Taupin, P., *Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells*. Int J Med Sci, 2008. **5**(3): p. 127-32.
91. Crisan, M., et al., *A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2425-33.
92. Joachimiak, R., A. Bajek, and T. Drewa, *Hair follicle as a novel source of stem cells*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012. **66**: p. 181-6.
93. Wilson, A., P.E. Butler, and A.M. Seifalian, *Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review*. Cell Prolif, 2011. **44**(1): p. 86-98.
94. Avraham-Lubin, B.C., et al., *VEGF Induces Neuroglial Differentiation in Bone Marrow-Derived Stem Cells and Promotes Microglia Conversion Following Mobilization with GM-CSF*. Stem Cell Rev, 2012.
95. Zhang, Y.S., et al., *Derivation, culture and retinal pigment epithelial differentiation of human embryonic stem cells using human fibroblast feeder cells*. J Assist Reprod Genet, 2012.
96. Asnaghi, M.A., et al., *A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: from concept to clinical trial*. Biomaterials, 2009. **30**(29): p. 5260-9.
97. Mertsching, H. and J. Hansmann, *Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **112**: p. 29-37.
98. Altman, G.H., et al., *Cell differentiation by mechanical stress*. FASEB J, 2002. **16**(2): p. 270-2.
99. Behonick, D.J. and Z. Werb, *A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte*. Mech Dev, 2003. **120**(11): p. 1327-36.
100. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
101. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
102. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
103. Freshney, I.R.V.-N.G., *Culture of Cells for Tissue Engineering*. John Wiley & Sons, 2006.
104. Pei, M., et al., *Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds*. FASEB J, 2002. **16**(12): p. 1691-4.
105. Niklason, L.E., et al., *Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries*. J Vasc Surg, 2001. **33**(3): p. 628-38.
106. Kadohama, T., et al., *Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival*. J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 244-51.

107. Holtorf, H.L., et al., *Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics*. Ann Biomed Eng, 2005. **33**(9): p. 1238-48.
108. Freed, L.E. and G. Vunjak-Novakovic, *Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity*. Biotechnol Bioeng, 1995. **46**(4): p. 306-13.
109. Tan, Q., et al., *Tissue-engineered trachea: History, problems and the future*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(5): p. 782-6.
110. Kobayashi, K., et al., *Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro*. Tissue Eng, 2006. **12**(9): p. 2619-28.
111. Scheller, K., et al., *Upcyte microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold*. Tissue Eng Part C Methods, 2012.
112. Vyavahare, N.R., et al., *Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships*. J Biomed Mater Res, 1998. **40**(4): p. 577-85.
113. Kushibe, K., et al., *Effects of warm ischemia and cryopreservation on cartilage viability of tracheal allografts*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(6): p. 1876-9.
114. Steger, V., et al., *Clinical tracheal replacement: transplantation, bioprotheses and artificial grafts*. Expert Rev Med Devices, 2008. **5**(5): p. 605-12.
115. Martinod, E., et al., *Long-term evaluation of the replacement of the trachea with an autologous aortic graft*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(5): p. 1572-8; discussion 1578.
116. Walles, T., *Tracheobronchial bio-engineering: biotechnology fulfilling unmet medical needs*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 367-74.
117. Walles, T., *Bioartificial tracheal grafts: can tissue engineering keep its promise?* Expert Rev Med Devices, 2004. **1**(2): p. 241-50.
118. Delaere, P., et al., *Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy*. N Engl J Med, 2010. **362**(2): p. 138-45.
119. Suzuki, T., et al., *Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2008. **117**(6): p. 453-63.
120. Okano, W., et al., *Bioengineered trachea with fibroblasts in a rabbit model*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2009. **118**(11): p. 796-804.
121. Kobayashi, K., et al., *A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(18): p. 4855-63.
122. Nakamura, T., et al., *In situ tissue engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(4): p. 811-9.
123. Imaizumi, M., et al., *Potential of induced pluripotent stem cells for the regeneration of the tracheal wall*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2010. **119**(10): p. 697-703.
124. Martinod, E., et al., *Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(3): p. 942-8; discussion 949.
125. Wurtz, A., et al., *Surgical technique and results of tracheal and carinal replacement with aortic allografts for salivary gland-type carcinoma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **140**(2): p. 387-393 e2.
126. Brown, P., *Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts*. AORN J, 2009. **90**(4): p. 513-20; quiz 521-4.

127. Geoffrion, R., et al., *Vaginal paravaginal repair with porcine small intestine submucosa: midterm outcomes*. Female Pelvic Med Reconstr Surg, 2011. **17**(4): p. 174-9.
128. Valentin, J.E., et al., *Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications. A comparative histologic study*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(12): p. 2673-86.
129. Badylak, S.F. and T.W. Gilbert, *Immune response to biologic scaffold materials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 109-16.
130. Badylak, S., et al., *Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device*. J Surg Res, 2002. **103**(2): p. 190-202.
131. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
132. Chapman, L.E., *Xenotransplantation, xenogeneic infections, biotechnology, and public health*. Mt Sinai J Med, 2009. **76**(5): p. 435-41.
133. Hunter, P., *Xeno's paradox: why pig cells are better for tissue transplants than human cells*. EMBO Rep, 2009. **10**(6): p. 554-7.
134. Cox, A. and R. Zhong, *Current advances in xenotransplantation*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005. **4**(4): p. 490-4.
135. Garkavenko, O., et al., *Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5353-6.
136. Yoo, D. and A. Giulivi, *Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses*. Can J Vet Res, 2000. **64**(4): p. 193-203.
137. Martin, U., et al., *Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells*. Lancet, 1998. **352**(9129): p. 692-4.
138. Takeuchi, Y., et al., *Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9986-91.
139. Bisset, L.R., et al., *Lack of evidence for PERV expression after apoptosis-mediated horizontal gene transfer between porcine and human cells*. Xenotransplantation, 2007. **14**(1): p. 13-24.
140. Di Nicuolo, G., et al., *No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver*. Xenotransplantation, 2005. **12**(4): p. 286-92.
141. Hermida-Prieto, M., et al., *Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus (PERV) to transplant recipients and abattoir workers in contact with pigs*. Transplantation, 2007. **84**(4): p. 548-50.
142. Krueger, W.S. and G.C. Gray, *Swine Influenza Virus Infections in Man*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012.
143. Mikkelsen, J.G. and F.S. Pedersen, *Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses*. J Biomed Sci, 2000. **7**(2): p. 77-99.
144. Jones, T.R., et al., *Endothelial cell surface expression and binding of factor VIII/von Willebrand factor*. Am J Pathol, 1981. **103**(2): p. 304-8.
145. Valentijn, K.M., et al., *Functional architecture of Weibel-Palade bodies*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5033-43.
146. Aznar-Salatti, J., et al., *Differential localization of von Willebrand factor, fibronectin and 13-HODE in human endothelial cell cultures*. Histochemistry, 1990. **93**(5): p. 507-11.

147. Hannah, M.J., et al., *Differential kinetics of cell surface loss of von Willebrand factor and its propolypeptide after secretion from Weibel-Palade bodies in living human endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22827-30.
148. Relaix, F. and P.S. Zammit, *Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage*. Development, 2012. **139**(16): p. 2845-56.
149. Liu Y, G.L., Prokopchuk O, Steinacker JM, *Satelittenzellaktivierung beim Krafttraining*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2007. **58**(1): p. 6-11.
150. Kassem, M., M. Kristiansen, and B.M. Abdallah, *Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004. **95**(5): p. 209-14.
151. Harichandan, A. and H.J. Buhring, *Prospective isolation of human MSC*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 25-36.
152. Ricart, E., *Current status of mesenchymal stem cell therapy and bone marrow transplantation in IBD*. Dig Dis, 2012. **30**(4): p. 387-91.
153. Kindler, V., et al., *Haematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells as tools for present and future cellular therapies*. Swiss Med Wkly, 2006. **136**(21-22): p. 333-7.
154. Sato, K., et al., *Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease : basic aspects and clinical outcomes*. J Clin Exp Hematop, 2010. **50**(2): p. 79-89.
155. Schanz, J., *Etablierung einer biologischen vaskularisierten Matrix als Grundlage für ein in vitro Lebertestsystem*. Dissertation, 2007.
156. Baiguera, S. and D. Ribatti, *Endothelialization approaches for viable engineered tissues*. Angiogenesis, 2012.
157. Michiels, C., T. Arnould, and J. Remacle, *Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1497**(1): p. 1-10.
158. Gigant-Huselstein, C., et al., *Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses*. Biorheology, 2004. **41**(3-4): p. 423-31.
159. Zaragoza, C., S. Marquez, and M. Saura, *Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(5): p. 446-52.
160. Dragt, B.S., et al., *Effect of laminar shear stress on the distribution of Weibel-Palade bodies in endothelial cells*. Thromb Res, 2012.
161. Cui, X., et al., *Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **425**(2): p. 419-25.
162. Koslow, A.R., et al., *A flow system for the study of shear forces upon cultured endothelial cells*. J Biomech Eng, 1986. **108**(4): p. 338-41.
163. Hansmann, J.G., F; Kahlig, A.; Schwarz, T.; , *Bioreaktorsysteme im Tissue Engineering*. Techno Pharm, 2012. **2**(3): p. 192-199.
164. Ratcliffe, A. and L.E. Niklason, *Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **961**: p. 210-5.
165. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(2): p. 80-6.

166. Martin, I., T. Smith, and D. Wendt, *Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(9): p. 495-502.
167. Eibl, R., et al., *Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **86**(1): p. 41-9.
168. Schechner, J.S., et al., *Engraftment of a vascularized human skin equivalent*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2250-6.
169. Novosel, E.C., C. Kleinhans, and P.J. Kluger, *Vascularization is the key challenge in tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 300-11.