

Aus der Klinik für Herzchirurgie
(Direktor Prof. Dr. med. Gregor Warnecke)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EVALUATION DER BESIEDELUNG VON POLYCAPROLACTONE MIT PORCINEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN FÜR DAS TISSUE ENGINEERING VON HERZKLAPPEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Tanja Marie Herberth
aus Stuttgart

Kiel (2024)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Lutter, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Seekamp, Klinik für Orthopädie und
Unfallchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2025

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 23.06.2025

gez.: Herr Prof. Dr. Georg Lutter (Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Herz.....	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie des Herzens.....	1
1.1.2 Herzklappenerkrankungen	2
1.1.3 Herzklappen und -prothesen	3
1.1.4 Therapiemöglichkeiten	5
1.2 Tissue Engineering	8
1.2.1 Tissue Engineering für Herzklappen.....	9
1.2.2 Zellen	10
1.2.3 Grundgerüst.....	11
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	13
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	14
2.1.3 ECM-Produkte	15
2.1.4 Zellen	16
2.1.5 Laborgeräte, Utensilien und Software	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Zellkulturbedingungen	17
2.2.2 Zellkultur	17
2.2.3 Ablösung der Zellen	17
2.2.4 Zentrifugation und Resuspension	18
2.2.5 Subkultivierung.....	18
2.2.6 Einfrieren.....	18
2.2.7 Auftauen.....	18
2.2.8 Zellzählung.....	19

2.2.9	Zellfärbungen	19
2.2.9.1	Hoechst und CellTracker Red	19
2.2.9.2	CellTox Green	19
2.2.10	Fixierung für das Rasterelektronenmikroskop	19
2.2.11	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	20
2.2.12	Versuche mit 24-Well PCL NanoECM-Platten	20
2.2.12.1	Vorbereitung und Beschichtung	20
2.2.12.2	Statische Besiedelung mit MSCs	21
2.2.12.3	Imaging	21
2.2.13	Versuche mit PCL-Gewebestücken	23
2.2.13.1	Vorbereitung	24
2.2.13.2	Besiedelung mit MSCs	24
2.2.13.3	Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie	24
2.2.13.4	Zugtestung	25
2.2.14	Statistische Analyse	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Ursprung der porcinen MSCs	27
3.2	Morphologische Charakterisierung der PCL-Materialien	27
3.3	Zellwachstum 24-Well PCL NanoECM-Platten	27
3.3.1	Unbeschichtete Platten	27
3.3.2	Vergleich unbeschichtete und beschichtete Platten	31
3.4	Zellwachstum PCL-Gewebestücke	36
3.4.1	Betrachtung der Oberflächen am REM	36
3.4.2	Dreidimensionale Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop	38
3.5	Mechanische Testung der PCL-Gewebestücke und Vergleich zu porcinen Pulmonalklappensegeln	41
3.5.1	Bruchpunkttestungen	41
3.5.2	Zyklische Zugtestung	45
4	Diskussion	48

4.1	Verhalten der pMSCs.....	48
4.1.1	Wachstumsverhalten auf PCL-Material	48
4.1.2	Zelldifferenzierung.....	50
4.2	Rolle der Beschichtung	51
4.3	Mechanische Eigenschaften	52
4.3.1	Elastizitätsmodul	53
4.3.2	Maximale Zugfestigkeit und Dehnungslängen	54
4.3.2.1	Bruchpunkttestungen.....	54
4.3.2.2	Zyklische Zugtestungen.....	56
4.4	Beurteilung des PCL-Materials als Gerüst für zukünftige Herzklappensegel	57
4.4.1	Besiedelungsart	58
4.4.2	Abbau	58
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	60
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Abbildungsverzeichnis.....	70
8	Tabellenverzeichnis.....	72
9	Publikation.....	73
10	Danksagung	74

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μl	Mikroliter
AV	Atrioventrikular
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EACTS	european association for cardio-thoracic surgery
E-Modul	Elastizitätsmodul
eNOS	endothelial nitric oxide synthetase, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESC	european society for cardiology
EZM	Extrazellulärmatrix, Englisch ECM (extracellular matrix)
FBS	fetal bovine serum, fetales Kälberserum
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
F_{max}	Maximalkraft, hier als maximale Zugfestigkeit/Zugkraft
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IQR	interquartile range, Interquartilsabstand
LVEF	left ventricular ejection fraction, linksventrikuläre Auswurfraction
LVESD	left ventricular end systolic diameter, linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
MSC(s)	mesenchymal stem cell(s)/multipotent mesenchymal stromal cell(s), mesenchymale Stammzelle(n)/multipotente mesenchymale Stromazelle(n)
N	Newton
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCL	poly- ϵ -caprolactone, Polycaprolactone
PGA	polyglycolic acid, Polyglykolsäure
PLLA	poly-L-lactic acid, Poly-L-Milchsäure
pMSC(s)	porcine mesenchymal stem cell(s), porcine mesenchymale Stammzelle(n)
PS	Penicillin/Streptomycin
REM	Rasterelektronenmikroskop
TAVI	transcatheter aortic valve implantation, Transkatheter-Aortenklappenimplantation
UTS	ultimate tensile strength, maximale Zugfestigkeit
VEC	valvular endothelial cells, endotheliale Herzklappenzellen
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIC	valvular interstitial cells, interstitielle Herzklappenzellen
X g	Schwerefeld ($\text{N/kg} = \text{m/s}^2$)

1 EINLEITUNG

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachform männlich, weiblich, divers (m/w/d) verzichtet. Dennoch sollen mit der verwendeten maskulinen Form alle Geschlechter und Geschlechtsidentitäten angesprochen werden. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1.1 HERZ

1.1.1 MAKROSKOPISCHE ANATOMIE DES HERZENS

Das Herz (Cor) ist ein muskuläres Hohlorgan, das durch Kontraktion den Blutfluss und dadurch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Körpers sicherstellt. Es ist unterteilt in 4 Innenräume, den rechten und linken Vorhof und die rechte und linke Kammer. Die rechte und linke Seite des Herzens werden durch das Herzseptum getrennt. Die Herzvorhöfe werden von den Herzkammern durch die beiden Segelklappen, die Mitralklappe und die Trikuspidalklappe getrennt. Sie haben zusätzlich Papillarmuskeln und Sehnenfäden (Chordae tendineae). Hierüber sind sie in den Herzkammern verankert, sodass sie sich in der Systole nicht entgegen dem Blutstrom in die Vorhöfe öffnen. Die Mitralklappe besteht aus zwei Segeln, einem anterioren und einem posterioren; die Trikuspidalklappe hat ein anteriores Segel, ein posteriores und ein septales. Die Aorten- und Pulmonalklappe befinden sich jeweils im Ausflusstrakt der Herzkammer und werden als Taschenklappen bezeichnet. Jede Klappe hat ein bindegewebiges Grundgerüst, den sogenannten Anulus fibrosus. Sowohl die Innenräume inklusive der Chordae tendineae und der Papillarmuskeln als auch die Herzklappen sind von Endothel überzogen (1,2). Sie öffnen und schließen passiv durch die mechanischen Kräfte, die über den durch die Herzaktion angetriebenen Blutfluss auf sie wirken. Hierdurch wird ein unidirektional gerichteter Fluss erreicht (3).

Die Spitze des Herzens wird als Apex cordis bezeichnet und zeigt nach links unten. Sie wird durch den linken Ventrikel gebildet. Der Apex (cordis) grenzt an das Zwerchfell und projiziert sich auf den fünften Interkostalraum in der Medioklavikularlinie (2).

Um den Herzmuskel, das Myokard, liegt der Herzbeutel. Dieser besteht aus zwei Schichten, dem Pericardium serosum und dem Pericardium fibrosum. Das Pericardium serosum wird wiederum unterteilt in die Lamina visceralis (= Epikard) am Herzen und der Lamina parietalis, die mit dem Pericardium fibrosum verwachsen ist. Lamina parietalis pericardii serosi und Pericardium fibrosum werden auch Perikard genannt (2).

Das Herz hat ein eigenes Erregungsbildungs- und -leitungssystem. Der Sinusknoten im rechten Vorhof ist der natürliche Schrittmacher. Die Erregung wird von dort über die Vorhöfe auf

den Atrioventrikular (AV)-Knoten im Herzseptum auf Höhe der Ventilebene übertragen. Hier wird das elektrische Signal kurz verzögert, sodass das Blut von den Vorhöfen in die Kammern gepumpt werden kann. Anschließend geht es weiter über das His- oder AV-Bündel, welches das Bindegewebe penetriert, das als Isolierschicht zwischen Vorhöfen und Kammern dient. Schließlich gelangt die Erregung zu den Kammer- oder Tawara-Schenkeln, welche die Herzmuskulatur der Kammern über Purkinje-Fasern zur Kontraktion anregen, angefangen von der Herzspitze nach oben (2).

1.1.2 HERZKLAPPENERKRANKUNGEN

Die Herzklappen können auf zwei Weisen ihre Funktion verlieren: Entweder schließen sie nicht mehr richtig, was als Insuffizienz bezeichnet wird, oder die Öffnung ist eingeschränkt, eine sogenannte Stenose (4).

Die Aortenklappenstenose ist die häufigste Klappenerkrankung in Europa und entsteht meistens aufgrund von Degeneration vorwiegend bei älteren Patienten (3,5–7). Ebenso ist eine insuffiziente Aortenklappe meist die Folge von Degeneration; hierbei spielen auch angeborene, bikuspidale Aortenklappen und das Marfan-Syndrom eine Rolle (6).

Die zweithäufigste Herzklappenerkrankung in Europa ist die Mitralklappeninsuffizienz (5,6,8). Ätiologisch liegt meist eine Degeneration der Klappe oder eine Schädigung der Sehnenfäden zugrunde (7,9). Eine Mitralinsuffizienz kann allerdings auch funktionell bedingt durch eine Erweiterung der linken Herzkammer auftreten (7). Als funktionelle oder sekundäre Klappeninsuffizienz wird ein Zustand bezeichnet, bei dem eine normale Klappe aufgrund veränderter Zugkräfte und verringerter Schließkräfte nicht ausreichend schließt (10). Häufig findet sich eine sekundäre Mitralklappeninsuffizienz bei Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie und daraus resultierender Vergrößerung des linken Ventrikels (6). Rheumatisches Fieber durch Streptokokken der Gruppe A verursacht häufig Mitralklappenstenosen, seltener Aortenklappenstenosen. Die Prävalenz ist im Vergleich vor allem in Ländern des Globalen Südens erhöht (5,6,11,12).

Des Weiteren kann die Trikuspidalklappe von Dysfunktionen betroffen sein. Eine Trikuspidalinsuffizienz ist mit 0,55 % selten, stellt aber laut Topilsky et al. (13) in den Industrienationen eine relevante Erkrankung dar, da sie mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist. Die häufigste Ursache in dieser Querschnittstudie ist eine funktionelle Insuffizienz durch eine Klappenpathologie des linken Herzens, gefolgt von einer pulmonalen Hypertonie und einer linksventrikulären Dysfunktion (13). Eine Stenose der Trikuspidalklappe hat meist ähnliche Ursachen wie eine Insuffizienz, insbesondere rheumatische Klappenerkrankung des linken Herzens (6).

Neben den erworbenen Klappenfehlern gibt es auch angeborene Ursachen, die zu Stenosen und Insuffizienzen führen. In der PAN-Studie zeigte sich eine Prävalenz von mehr als 7.000 angeborenen Herzfehlern an allen Geburten pro Jahr für Deutschland (14). Dies entspricht einer Prävalenz von 107,6 pro 10.000 Lebendgeburten, also ca. 1 % (14,15). Ein Teil dieser Fehlbildungen entfällt auf Herzklappenfehler (14). In den Ländern des Globalen Südens steigt die Anzahl an Neugeborenen, Kindern und Jugendlichen mit Herzklappenfehlern (4). Der häufigste angeborene Klappenfehler ist die Pulmonalklappenstenose mit 6–7 % aller Herzfehler (14,15). Verbreitet ist außerdem die Aortenstenose mit einem Anteil von 4–6 %. Sie betrifft vor allem männliche Säuglinge. Weitere Klappenfehler sind selten (15).

Ein komplexer Herzfehler ist die Fallot-Tetralogie. Sie umfasst vier Fehlbildungen: eine Pulmonalstenose, eine Vergrößerung des rechten Ventrikels (Hypertrophie), einen Ventrikelseptumdefekt und eine darüber reitende, nach rechts verlagerte Aorta und hat einen Anteil von 5–6 % an allen angeborenen Herzklappenerkrankungen. (15).

Auch bei Kindern mit Ventrikelseptumdefekt, dem häufigsten angeborenen Herzfehler finden sich häufig Klappenanomalien (15,16). Gemäß einer prospektiven Studie von Glen et al. haben 2,7 % der untersuchten Patienten mit Ventrikelseptumdefekt eine Pulmonalklappenstenose, 3,6 % einen Aortenklappenprolaps und damit eine insuffizient schließende Aortenklappe und 0,8 % eine Mitralklappeninsuffizienz (16).

1.1.3 HERZKLAPPEN UND -PROTHESEN

Alle vier Klappen bestehen aus einem Bindegewebsgerüst, das von Endothel überzogen ist und befinden sich in einer Ebene, der sogenannten Klappen oder Ventilebene (1,2). Auch die Schichtung ist bei allen vier Klappen vergleichbar. Es gibt drei Schichten, in Klammern stehen jeweils die Benennungen der jeweiligen Schicht für die Aortenklappe. Auf der dem Blutfluss abgewandten Seite (in Richtung Aorta/Pulmonalarterie bzw. der Kammern) findet sich eine Schicht aus straffem kollagenem Bindegewebe hauptsächlich aus Kollagenfasern, die der Formerhaltung dient und die meiste Kraft abfängt (Lamina fibrosa) (17,18). In der Mitte befindet sich eine Schicht aus lockerem Bindegewebe mit viel Hyaluronan und Proteoglykanen, als „Polster“ (Lamina spongiosa) (1,17,18). Die andere Seite ist den Scherkräften ausgesetzt (1). Sie befindet sich in Richtung der Vorhöfe bzw. der Kammern und besteht aus viel Elastin (Lamina ventricularis) (17). Wie bereits angedeutet, befinden sich in der Fibrosa die meisten Kollagenfasern, die für eine hohe Zugfestigkeit sorgen (19). Die Klappen sind physiologischer Weise gefäßfrei, die Nährstoffversorgung erfolgt bis zur Basis der Klappen über Blutgefäße, im restlichen Teil per Diffusion (1). Histologisch finden sich an der Oberfläche endotheliale Herzklappenzellen (valvular endothelial cells, VEC) und im Inneren der Klappen interstitielle Herzklappenzellen (valvular interstitial cells, VIC), die Extrazellulärmatrix (EZM) wie

Hyaluronsäure und Glykosaminoglykane produzieren (1,3,17). Die Zellen, vornehmlich die VICs, reagieren auf mechanischen Stress und führen durch Umbau des Gewebes zu einer Anpassung und Erhaltung der Homöostase (3).

Vor allem die Aortenklappe verdient Aufmerksamkeit, da sie heutzutage häufig ersetzt wird (7). Als mechanischer Herzklappenersatz wird heute standardmäßig die Zweiflügelklappe verwendet. Diese besteht in der Regel aus Karbon und ist damit so haltbar, dass sie ein Menschenleben überdauert (20). Ein wesentlicher Nachteil der mechanischen Herzklappe ist die dringend erforderliche lebenslange Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten (Phenprocoumon, Warfarin) aufgrund des erhöhten Thromboserisikos durch das Fremdmaterial und den nicht laminären Fluss entlang der Klappe (20–24). Bei Therapie mit Vitamin K-Antagonisten können Nebenwirkungen wie Blutungen, z. B. von Nase oder Zahnfleisch, aber auch im Gehirn auftreten (22). Das Risiko für schwerwiegende Blutungskomplikation liegt bei 3 pro 100 Patientenjahre (20,22,25). Die besonders gefürchteten zerebralen Blutungen haben ein Risiko von 0,5 % pro Jahr (22). Zudem kann es trotz Antikoagulation in 2 pro 100 Patientenjahren zu einer Klappenthrombose kommen (20).

Die Alternative zur mechanischen Klappe ist eine biologische. Es gibt diese aus dem Schwein oder rekonstruierte Klappen aus Rinder- oder Schweineperikard. Wobei Rinderperikard heute als Goldstandard gilt (21). Diese xenogenen Klappenprothesen sind durch Glutaraldehyd fixiert, was zu einer Quervernetzung der Kollagenfasern durch Amine führt (26) und damit die Struktur und das Gewebe besser erhalten bleibt als bei einer Formaldehydfixierung. Bei dieser bilden sich weniger stabile Methylen-Proteinquervernetzungen (1,24,27,28). Zusätzlich wird das Klappengewebe sterilisiert. Diese Behandlung verhindert eine Immunreaktion der Patienten auf das tierische Gewebe sowie den Abbau des xenogenen Materials (26). Allerdings führt die Glutaraldehydfixierung neben der Quervernetzung von Kollagenfasern auch zu einem erhöhten Kalzifikationspotential (29). Die Klappen sind häufig auf einem Plastik- oder Metallgerüst, dem Stent, befestigt und werden in der Regel durch eine Naht in der gewünschten Position am Herzen fixiert (20,24). Alternativ gibt es gerüstfreie biologische Klappen, die direkt in die Aortenklappenposition eingenäht werden. Dies ist anspruchsvoller und nicht für den Ersatz der Segelklappen geeignet (24). Positiv hervorzuheben ist bei biologischen Klappen, dass nach Implantation nur eine kurzzeitige Antikoagulation nötig ist, da sie einen physiologischen Blutfluss ermöglichen (20). Der Nachteil der biologischen Klappenprothesen ist die kürzere Haltbarkeit von 10–17 Jahren (20,30). Dies lässt sich zum einen durch Insuffizienzen aufgrund von Gewebeeinrissen erklären (30). Andererseits kann eine Kalzifikation der Bioprothese auftreten, was zu einer Stenose führt (4,29). Laut des Deutschen Herzberichts von 2020 besteht ein sich fortsetzender Trend vermehrt biologische Klappen einzusetzen, da ein großer Teil der Operationen bei älteren Personen, insbesondere ab 70 Jahren, nötig sind, bei denen die Klappenhaltbarkeit keine entscheidende Rolle mehr spielt (7,30). Zudem gibt es Hinweise darauf,

dass die Funktion von biologischen Klappen bei Personen ab 65 Jahren länger als 20 Jahre erhalten bleibt (7).

Es gibt auch menschliche biologische Klappenprothesen, sogenannte Homo-, Allo- oder Autotransplantate (20,21,31). In diesem Fall wird die Klappe einer verstorbenen Person verwendet (Homo- oder Allograft) oder die patienteneigene Pulmonalklappe wird für den Ersatz der Aortenklappe verwendet (Autograft, manchmal auch Homograft benannt) (20,21,31). Diese Art des Klappenersatzes wird zur Therapie von angeborenen Herzfehlern, welche die Pulmonalklappe betreffen, und bei der Operation nach Ross (s.u.) eingesetzt (31). Allerdings finde diese Art des Klappenersatzes wegen der geringen Verfügbarkeit solcher Implantate, gerade in Größen für Kinder, und aufgrund eines komplizierten und teuren Operationsverfahrens selten Anwendung (20,24,31). Laut einer Studie von Forbess et al. (31) haben Allografts eine unterschiedliche Haltbarkeit, abhängig davon bei welcher Patientengruppe sie eingesetzt werden. Bei Patienten im Säuglingsalter liege die 5-Jahres-Überlebensrate der Homografts, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass in diesem Zeitraum keine Re-Operation nötig ist, bei weniger als 25 %. Bei Kindern bis 10 Jahren sei sie bereits 61 % und bei Patienten, die älter als 10 Jahre sind, betrage sie 81 %. Zudem sei die Lebensdauer in der Pulmonalposition länger als in der Aortenklappenposition (31).

1.1.4 THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Will man eine **Aortenklappe** ersetzen, muss der Thorax geöffnet werden, um Zugang zum Herzen zu erhalten. Das Herz wird angehalten und der Körper über eine Herz-Lungen-Maschine mit Blut versorgt, da der Klappenersatz filigranes Arbeiten erfordert und Herzaktionen dies erschweren würden. Neben der Möglichkeit über eine mediane Sternotomie zu operieren, kann die Aortenklappe auch minimal-invasiv über eine obere Hemisternotomie (bis zum dritten oder vierten Interkostalraum) erreicht werden. Die Vorteile bei diesem Zugang sind eine kleinere Wunde und Narbe, weniger Schmerzen und ein geringeres Infektionsrisiko. Außerdem kann früher extubiert werden, da die Thoraxwand stabiler und so die Atmung weniger eingeschränkt ist. Dies bedingt zudem einen kürzeren Aufenthalt auf der Intensivstation. Zusätzlich kann die Aortenklappe auch über eine anterolaterale Minithorakotomie mit Schnitt über der dritten Rippe erreicht werden (21). Neben Wundinfektionen kann es durch eine Aortenklappenoperation zu Blutverlust, Wundheilungsstörungen, in 7 % der Fälle zu Reizleitungsstörungen mit der Notwendigkeit zur Schrittmacherimplantation und zu Aortendissektionen kommen (7,21). Allerdings ist das Risiko für Reizleitungsstörungen bei nahtfreien Klappen, Homografts und Transkatheter-Aortenklappen-Operationen mit 14 bis 28 % deutlich höher (21).

Vor allem symptomatische Aortenklappeninsuffizienzen werden leitliniengerecht (6,32) immer operiert. Manchmal kann auch ein nahe der Aortenklappe gelegener Ventrikelseptumdefekt

einen Klappenersatz notwendig machen (15). Ebenso wird bei symptomatischen Aortenklappenstenosen ein Klappenersatz empfohlen (6).

Bei Notwendigkeit eines Aortenklappenersatzes gibt es gerade für jüngere Patienten, z.B. bei solchen mit einer angeborenen Aortenklappenstenose, auch die Möglichkeit der Ross-Operation (21). Hierbei wird die Pulmonalklappe des Patienten als Autograft anstelle der Aortenklappe hinter die linke Herzkammer gesetzt (20). Die nun fehlende Pulmonalklappe wird durch eine biologische Klappe ersetzt (20). Da sich diese im Lungenkreislauf im Niederdrucksystem befindet, ist die Lebensdauer der Prothese länger als in der Aortenposition (21). Ebenso weist die ehemalige Pulmonalklappe in der Aortenposition eine lange Haltbarkeit von über zehn Jahren auf und kann sogar lebenslang halten (31,33). Dennoch verringere sich die Anzahl der lebenden Zellen in dem Pulmonalklappen-Gewebe bis schließlich keine mehr nachgewiesen werden könnten (23,33). Zudem ist keine Antikoagulation nötig (21). Der Nachteil ist jedoch, dass der Eingriff komplexer und teurer ist, als nur eine Klappe zu ersetzen (21,31). Da man beide Klappen verändert, sind beide Klappen prädestiniert für erneute Erkrankungen, beispielsweise kann die ehemalige Pulmonalklappe durch die hohen Drücke degenerieren oder die biologische Klappe in der Pulmonalposition kalzifizieren und stenosieren (21,34). Bei Kindern, gerade bei Neugeborenen, werde die Lebensdauer des Autografts vermutlich durch ein aktiveres Immunsystem erheblich verringert (31,33). Wie bereits zuvor erwähnt, ist außerdem das Risiko für eine Reizleitungsstörung mit 14 bis 28 % deutlich höher als bei der konventionellen Aortenklappenchirurgie (21).

Zudem lassen sich Klappen über interventionelle transfemorale oder selten (bei besonders arteriosklerotischen Beckengefäßen) transapikale Zugänge einbringen (7,21). Die sogenannte Transkatheter-Aortenklappen-Implantation, kurz TAVI (transcatheter aortic valve implantation) wird vor allem bei Patienten eingesetzt, die wegen eines mittleren bis hohen Operationsrisikos, bspw. aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes, nicht für eine offene Operation mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in Frage kommen (7,20,21). Die TAVI ist auch ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine am schlagenden Herzen möglich. Die Klappen sind wie biologische Klappen aus Rinder- oder Schweineperikard und in einem Gerüst (Stent) befestigt. Über die Haltbarkeit dieser Klappen gibt es nur eingeschränkt Daten (20). In aktuellen Studien wurde die Klappenfunktion innerhalb von acht Jahren beobachtet. Die Ergebnisse sprechen für eine gute Haltbarkeit der Klappen in diesem Zeitraum (6,35).

In seltenen Fällen wird auch die **Pulmonalklappe** isoliert ausgetauscht. Ein Beispiel hierfür sind Patienten mit einer Fallot-Tetralogie, bei welchen der Lungenkreislauf unterentwickelt ist. In diesem Fall ist auch häufig die Pulmonalklappe stenosiert. Falls dies nicht mit anderen operativen Therapien behoben werden kann, wird die Klappe ersetzt. Neben dem Klappenersatz am offenen Herzen ist die Therapie auch perkutan möglich (15).

Die Versorgung der **Mitral-** und **Trikuspidalklappenerkrankungen** erfolgt durch Rekonstruktion (Anulo- oder Valvuloplastie) und Ersatz (6,7,21). Interventionell gibt es die Möglichkeit der transseptalen Edge-to-edge-Therapie, wobei die freien Bereiche der Segelklappe mittig verbunden werden, zum Beispiel mit Hilfe des MitraClip®-Systems (7,36,37).

Sekundäre Insuffizienzen sowie Stenosen allgemein werden idealerweise im Zuge einer Links-herz-Operation mitbehandelt, was zu einem „reverse remodelling“ führe (38).

Die kommerziell erhältlichen Möglichkeiten des Herzklappen-Ersatzes haben einiges Verbesserungspotenzial. Biologische Herzklappen degenerieren und verlieren somit über die Zeit ihre Funktion (20). Dahingegen haben mechanische Herzklappen zwar eine ausreichend lange Haltbarkeit. Jedoch bergen sie das Risiko für schwerwiegende Blutungen, da eine lebenslange Einnahme von Vitamin K-Antagonisten nötig ist (20,21). Insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen zeigen sich beide Nachteile umso deutlicher. Bei kongenitalen Herzklappenerkrankungen liegt eine hohe Morbidität und Mortalität vor (15,33). Die aktuellen Herzklappenprothesen können weder vom Körper repariert werden noch sich dem noch wachsenden Herzen anpassen. Die Klappenprothesen werden bei den jungen Patienten aufgrund ihrer Größe außerhalb der physiologischen Position in den rechtsventrikulären Ausflusstrakt eingesetzt und müssen alle paar Jahre mit einer größeren Klappe ersetzt werden. (3,4,18). Bei biologischen Klappen müssen sie sich vielen Re-Operationen unterziehen, da diese Klappen gerade bei jungen Patienten schnell kalzifizieren und stenosieren. Zusätzlich besteht bei mechanischen Herzklappen das Risiko für Infektionen und Thrombosen, weshalb lebenslang Vitamin-K-Antagonisten eingenommen werden müssen, was gerade bei aktiven Kindern ein hohes Blutungsrisiko birgt und bei Schwangerschaftswunsch kontraindiziert ist (18,22). Die Operation nach Ross werde häufig als Therapie für Aortenklappenerkrankungen bei Kindern verwendet und als sicher eingestuft (34,39,40). Allerdings treten bei jüngeren Patienten häufiger Dilatation oder Stenosen auf als bei älteren Patienten (4,34).

Vitale tissue-engineerte Herzklappen wären im pädiatrischen Bereich die ideale Lösung, da sie das Potential haben mitzuwachsen. Somit wäre nur eine Operation erforderlich. Dies würde die Morbidität und Mortalität verringern und die Lebensqualität erheblich verbessern (33).

Zudem entstehen durch die ständig nötige Medikation, regelmäßigen Kontrollen und möglichen Komplikationen enorme Kosten für das Gesundheitssystem, welche durch vitale Herzklappenprothesen vermieden werden können. David Clarke hat diese 2002 für das amerikanische Gesundheitssystem berechnet und kommt auf Kosten von mindestens 1,38 Milliarden US\$ pro Jahr bei n = 30.000 mechanischen Klappen pro Jahr (41).

1.2 TISSUE ENGINEERING

Betrachtet man die Warteliste für eine Organspende, so wird deutlich, dass die Nachfrage an Organen für eine Transplantation das Angebot bei weitem übersteigt (42).

Es stellt sich daher die Frage, wie sichergestellt werden kann, dass eine medizinische Versorgung auf hohem Niveau auch dann gewährleistet werden kann, wenn ein Organersatz notwendig ist.

Tissue Engineering wurde 1988 in der Konferenz der National Science Foundation (NSF) zum ersten Mal definiert (43). Seitdem wurde Tissue Engineering in vielen verschiedenen medizinischen Disziplinen angewendet (3,44–50).

Am häufigsten werde ein geeignetes, abbaubares Grundgerüst mit autologen Zellen besiedelt, in-vitro gezüchtet und dann implantiert (3). Einige Beispiele sind biologische Hautersatzstoffe zur Deckung von Ulzera, wie das kommerziell erhältliche Apligraf® (51) und autologe Chondrozyten, als Ersatz für geschädigten Knorpel im Knie, bspw. Carticel®, Genzyme, USA (52). Der Auswahl der Zellen für das herzustellende Gewebe komme eine besondere Bedeutung zu. Sie müssen isoliert und kultiviert werden können und sollten idealerweise humanen Ursprungs sein, da hier die geringste Gefahr einer Kontamination mit Organismen bestehe, die für den Empfänger (d.h. den Menschen) unbekannt oder schädlich seien (43). Stammzellen sind hierfür gut geeignet, da sie wichtige biologische Eigenschaften aufwiesen, wie eine unbegrenzte Selbsterneuerung und die Fähigkeit sich in verschiedenes Gewebe zu differenzieren, wodurch sie gut in-vitro expandiert werden können (3,53,54). Die Zellen sollten so gewählt sein, dass das tissue-engineerte Gewebe schließlich die gleichen mechanischen und funktionellen Eigenschaften wie das physiologisch vorhandene Gewebe aufweise, zum Beispiel Dehnbarkeit oder Festigkeit (3,43). Es müsse ebenfalls auf den Aufbau des Grundgerüsts geachtet werden, beispielsweise auf die Porengröße und die Zwischenräume. Meistens sei es gewünscht, dass das Grundgerüst degradiert (43). Biodegradation oder biologischer Abbau wurde von Vert folgendermaßen definiert: *„Der Begriff "biologisch abbaubar" ist festen polymeren Produkten vorbehalten, die zu Makromolekülen abgebaut werden, welche sich im Körper eines Tieres verteilen, aber nicht nachweislich aus dem Körper ausgeschieden werden [...]“* (55). Dagegen bedeute „bioresorbierbar“, dass sie aus dem Körper eliminiert würden (55). Der Abbau solle in der gleichen Geschwindigkeit ablaufen, wie das Zellwachstum und die EZM-Entwicklung (43). Durch den Abbau dürfen keine toxischen Metaboliten im Körper entstehen und das Material sollte gut verträglich sein (3,43).

1.2.1 TISSUE ENGINEERING FÜR HERZKLAPPEN

Dr. Dwight Harken nannte bereits 1962 Kriterien für den perfekten Herzklappenersatz, die bis heute immer wieder zitiert werden (56). So soll eine ideale Herzklappe einen physiologischen Blutfluss ermöglichen, schnell (in weniger als 0,05 sec) und zur richtigen Zeit schließen, keine Embolien verursachen, keine Blutbestandteile schädigen und biokompatibel sein; außerdem nicht degenerieren, zum Beispiel kalzifizieren oder ihre Form verändern (56). Über die Zeit kamen weitere hinzu, so zum Beispiel von Sacks und Schoen (3,57): Herzklappen sollen idealerweise vital sein, um mit den größer werdenden Herzen von Kindern mitzuwachsen, sich anzupassen und ein Leben lang zu halten.

Bei tissue-engineerten Herzklappen muss besonders darauf geachtet werden, dass die funktionellen Eigenschaften einer Herzklappe erfüllt werden. Unter anderem Geometrie, Compliance und Biegeverformung müssten mit nativen Klappen übereinstimmen (3,18). Von Beginn an ist die Prothese im Herzkreislaufsystem hohen mechanischen Kräften ausgesetzt. Diese wirken zunächst auf das Grundgerüst ein, bis die Zellen genügend Extrazellulärmatrix produziert haben. Nach und nach degradiert das Polymergerüst bis schließlich kein Fremdmaterial mehr übrig bleibt (3).

Zur optimalen Entwicklung des Gewebes sind mechanische Stimuli ähnlich der späteren Umgebung im Herzkreislaufsystem vorteilhaft. Idealerweise würden die Klappen in einem Bioreaktor kultiviert werden, der die zyklischen Druckunterschiede imitiert (3). Dabei zeigten sich bessere mechanische Eigenschaften, einhergehend mit mehr EZM und einem organisierteren histologischen Aufbau (45).

Das Ziel der Forschung ist ein Herzklappenersatz besiedelt mit lebenden, autologen, synthetisch aktiven Zellen (4,44). Diese zu Wachstum, Reparatur und Umbau fähigen Klappen würden somit einige aktuelle Probleme, wie die Gefahr der Herzklappeninfektion oder die wiederholten Operationen bei Kindern, lösen (3,44). Es könnte sich auch herausstellen, dass diese Art des Herzklappenersatzes kostengünstiger ist als mechanische oder xenogene Herzklappenprothesen (3). Als erstes großer Zwischenschritt bietet es sich an, gezüchtete Herzklappen als Ersatz für Pulmonalklappen herzustellen. Da hier die mechanischen Belastungen geringer sind, sollte dies früher erreichbar sein. Im Rahmen der Ross-OP könne so die Aortenklappe durch die autologe Klappe ersetzt werden. Dies sei gerade bei Kindern wichtig, da die so eingesetzte tissue-engineerte Herzklappe in der Pulmonalposition mitwachsen und auf eine Re-Operation verzichtet werden könne. Hiervon profitierten unter anderem Heranwachsende in Ländern des Globalen Südens, die von einer rheumatischen Herzklappenerkrankung betroffen sind. Das endgültige Ziel sollte aber der direkte Ersatz der Aortenklappe durch tissue-engineerte Klappen sein. (2,4,58,59).

1.2.2 ZELLEN

Laut Sutherland et al. (53) sind mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark gut für die Herstellung von Herzklappen geeignet, da sie verhältnismäßig leicht aus dem Knochenmark entnommen werden und sich in verschiedene Zellen differenzieren können. Als Stammzellen sind sie zur Selbsterneuerung fähig (60). So wurde gezeigt, dass eine tissue-engineerte Pulmonalklappe aus MSCs im Schafmodell über acht Monate gute Ergebnisse erzielt (53). Als Erstbeschreiber der MSCs gelten Friedenstein et al (54,61). Sie werden auch marrow stromal oder mesenchymal stromal stem cells bezeichnet und stammen aus dem Mesoderm (54).

Im Jahr 2005 definierte die internationale Gesellschaft für Zelltherapie (international society for cellular therapy) MSCs als Zellen mesenchymalen Ursprungs, die an Plastik adhären, und führte den Begriff „multipotent mesenchymal stromal cells“ (multipotente mesenchymale Stromazellen, = MSCs) ein (62). In der Tat gebe es immer noch Fragen zu Herkunft und zum Differenzierungspotential der MSCs (54). Verschiedene Arbeitsgruppen und Labore hätten unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsprotokolle für diese Zellen und es sei nicht klar, ob dadurch nur verschiedene Phänotypen derselben Zellart oder doch verschiedene Populationen der heterogenen Zellen aus dem Knochenmark gezüchtet würden (54,62). Nicht alle dieser Zellen erfüllten die Kriterien für Stammzellen im engeren Sinne (62). Dennoch werden MSCs zu den adulten Stammzellen gezählt (54). Im Gegensatz zu anderen Stammzellen, wie embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen, bergen adulte Stammzellen nicht das Risiko, dass sich aus ihnen ein Teratom oder Tumor entwickelt (54,60). Jedoch zeigen Ergebnisse von Bennett et al. (63) sowie Bianco et al. (64), dass sich differenzierte Bindegewebs-Zellen, unter anderem Adipozyten und Retikularzellen, in andere Zelltypen umwandeln könnten. Somit bestehe Grund zur Annahme, dass auch differenzierte Zellen des Bindegewebes multipotent seien (65). Nachfolgend wird der Begriff MSCs für mesenchymale Stammzellen verwendet, da die in dieser Arbeit verwendeten Zellen vom Hersteller als ebensolche bezeichnet werden.

MSCs sind als Teil des Mesenchyms Vorläufer für Bindegewebe (Fibroblasten, Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten), quergestreifte Muskelzellen und Zellen des Gefäßsystems (1,54,60). Nach Verletzungen durch Strahlenbelastung wurden sie unter anderem in Knochenmark, Haut und Muskeln gefunden (66). Physiologischer Weise schützen Stromazellen hämatopoetische Stammzellen vor apoptotischen und Differenzierungs-Einflüssen und tragen so dazu bei, dass der Stammzellpool erhalten bleibt (67).

MSCs haben viele verschiedene Einsatzgebiete: Sie spielen eine Rolle in der Wundheilung, können Wachstumsfaktoren sezernieren und das Immunsystem und Autoimmunerkrankungen beeinflussen (60).

1.2.3 GRUNDGERÜST

Die Matrix, welche als Grundgerüst für die zukünftige Herzklappenprothese dient, sollte gewisse Anforderungen erfüllen (3): eine Oberfläche, auf der Zellen anwachsen, Leerräume, in die das Gewebe einwachsen kann und wodurch die Nährstoffe und Transmitter diffundieren können sowie mechanische Zugstabilität bei gleichzeitiger Flexibilität. Die Fasern sollten im Durchmesser nicht größer sein als die Zellen (68).

Unter anderem werden dezellularisierte Tiergewebe auf Grund der guten Biokompatibilität und der physiologischen Ultrastruktur und Form als Grundgerüst genutzt (43,69,70). Das Ziel der Dezellularisierung ist es, alle zellulären und nukleären Bestandteile zu entfernen und so Immunreaktion und Abstoßung zu vermeiden. Bestandteile der EZM, wie Kollagen und die mechanischen Eigenschaften sollten erhalten bleiben. Dies geschieht durch Kombination von physikalischen (Einfrieren, Ultraschall, Druck, ...) und chemischen Prozessen (Enzyme, hypotone Lösungen, ...). (70) Es gibt sogar kommerziell erhältliche dezellularisierte Klappen (4). Allerdings zeigten sich hier noch häufig Komplikationen (71–73).

Im Tissue Engineering-Bereich gibt es zwei verschiedenen Arten von Matrices, zum einen Nadelvliesstoffe, zum anderen elektrogesponnene Grundgerüste (3). Nadelvliesnetze sind ein häufig genutztes Grundgerüst (74,75). Sie werden aus Polymeren wie Polyglykolsäure (PGA, polyglycolic acid) und Poly-L-Milchsäure (PLLA, poly-L-lactic acid) hergestellt, die durch Widerhaken und Hitze zu einem Vlies verbunden werden (74). Elektrogesponnene (Electrospinning-)Gewebe werden durch elektrostatische Anziehungskräfte produziert (76). Es wird ein elektrisches Feld zwischen einer Nadel, die mit Polymerflüssigkeit gefüllt ist, und einem geerdeten Metallgitter/-kollektor aufgebaut, wodurch das Polymer als ein langgezogener Faden Richtung Kollektor gezogen wird und dabei trocknet, da die Flüssigkeit verdunstet (77,78). Die Flugroute kann durch das elektrische Feld beeinflusst werden. So entsteht nach und nach das gewünschte Material, in der Regel ein Vlies (nonwoven) (78). Der Faserdurchmesser und die Porendichte könne je nach Einstellungen variiert werden. Die Eigenschaften solcher Gewebe sind eine hohe Durchlässigkeit bei einer sehr kleinen Porengröße, hohe Zugfestigkeit und eine geringe Luftpermeabilität. Die Faserdicke ist im Nanometerbereich, weshalb auch von Nanofasern gesprochen wird (76,77).

Aus **Poly- ϵ -caprolactone (PCL)** lässt sich durch Elektrosponnen ein solches Grundgerüst herstellen. Es ist ein anisotroper, aliphatischer Polyester mit einer ähnlichen Festigkeit wie native Herzklappen (19). Es ist gut mit anderen Polymeren mischbar (79) und zeigt eine gute Biokompatibilität bei einer Porengröße, die das Einwachsen der Zellen unterstützt (80–82). So konnten Lam et al. (80) keine Ansammlung von Immunzellen nach 6 Monaten in in-vivo Implantation nachweisen und es fand eine gute Integration in das umliegende Gewebe inklusive Vaskularisation statt. PCL ist ein teilkristalliner, hydrophober Stoff mit einem Schmelzpunkt bei 59°C bis 64°C (19,81). Es wird angenommen, dass der Abbau in-vivo über oberflächliche

Erosion, auch heterogene Erosion genannt, erfolgt (80,83). Dies lässt sich durch die Hydrophobizität aufgrund der semikristallinen Struktur des PCLs erklären, wodurch Wasser nur in oberflächliche Schichten des Materials eindringen kann und für den Abbau sorgt (83). Andererseits konnte bei weiteren Experimenten nach 40 Monaten Beobachtungszeit auch ein Massenabbau (bulk degradation oder homologe Erosion) vermutet werden. Durch die oberflächliche Erosion bleibe die mechanische Stabilität länger erhalten und das Molekulargewicht der Probe verändere sich anfänglich nicht. Die Degradation dauere länger als sechs Monate (80).

1.3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Besiedelung und das Wachstum von porcinen mesenchymalen Stammzellen auf PCL-Matrices evaluiert, deren Fasern willkürlich angeordnet sind (randomly-oriented).

Folgende Fragestellungen wurde nachgegangen:

- Wie ist das Wachstumsverhalten von porcinen MSCs auf PCL-Platten und PCL-Gewebe? Gibt es einen Unterschied zwischen Platten und Gewebestücken?
- Welchen Einfluss hat eine Beschichtung der PCL-Fasern auf die Anhaftung und das Wachstumsverhalten der porcinen MSCs?
- Kommt es zu einem Einwachsen der porcinen MSCs in das PCL-Gewebe?
- Welche mechanischen Eigenschaften zeigen sich bei Zugtestungen der besiedelten PCL-Gewebe?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	Promega Corporation, Madison. WI, USA; <i>LOT: 0000437708, 0000426349</i>
CellTracker™ Red CMTPX	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; <i>LOT: 2268340</i>
CryoSure-Dimethylsulfoxide (DMSO)	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO) Cell culture grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland & Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spa- nien
DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlö- sung, PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (1X)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA & Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EmbryoMax® Ultrapure water with 0.1% Gel- atin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolute	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
FBS, qualified, HI, fetal bovine serum fetales Kälberserum, , / fetal calf serum (FCS)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexamethyldisilazane (HMDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33342, trihydrochlorid trihydrate	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; <i>LOT: 2161855</i>
MatriGel®	Corning Inc, Corning, NY, USA
Penicillin-Streptomycin (PS)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Roti®-Histofix 10% Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; <i>Charge: 090292161</i>
Trypsin-EDTA 0,25%	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Wasser doppelt destilliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum (Invitrogen)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Bezeichnung der Lösungen und Medien	Zusammensetzung
CellTox Green-Färbelösung	0,5 ml CellTox™ Green Cytotoxicity Assay Puffer + 0,5 µl CellTox™ Green Cytotoxicity Assay
Cryo-Lösung	FCS + 10 % Cryo-DMSO
Hoechst-CellTracker Red-Färbelösung	1 ml DMEM + 0,33 µl Hoechst 33342 + 0,5 µl CellTracker Red CMTPX
MatriGel®-Beschichtungslösung	1µl MatriGel® in 120 µl PBS (1:120)
MSC-Medium	DMEM + 10 % FCS + 1 % PS
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin-EDTA in PBS
Ziegenserumlösung	DMEM + 10 % Ziegenserum

2.1.2 VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE

Die mit * gekennzeichnete Plastikware wurde steril bezogen.

Verbrauchsgegenstände	Hersteller
Deckgläser 34 x 32 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Feather® Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Nunc CryoTube™ Vialis*	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Objektträger adhäsiv, silanisiert, geschliffen, 90°, Mattrand weiß	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Parafilm ,M'	Bemis, Amcor, Zürich, Schweiz
Pipettenspitzen Pipetus® Spitzen 10 ml*	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen Pipetus® Spitzen 25 ml*	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Pipetus® Spitzen 5 ml*	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen verschiedene Größen, autoklaviert	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland & VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml, autoklaviert	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhre 15 ml*	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhre 50 ml*	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stiftprobenteller-Klebefläche, Ø 12/25 mm	PLANO GmbH, Wetzlar, Germany, Agar Scientific Ltd., Essex, GB
Tissue culture plate, 12-Well-Platte*	Corning Inc, Corning, NY, USA
Tissue culture-Platte 6 well, Standard F*	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche, TC-Flasche T75, Standard*	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 ECM-PRODUKTE

Die ECM (EZM)-Produkte wurden steril bezogen.

ECM-Produkt	Hersteller
24-Well-Plate; 700 nm Poly- ϵ -caprolactone NanoECM (willkürlich ausgerichtete Fasern)	Nanofiber Solutions, Dublin, OH, USA
Poly- ϵ -caprolactone NanoECM Gewebe-Stücke 700 nm (willkürlich ausgerichtete Fasern)	Nanofiber Solutions, Dublin, OH, USA

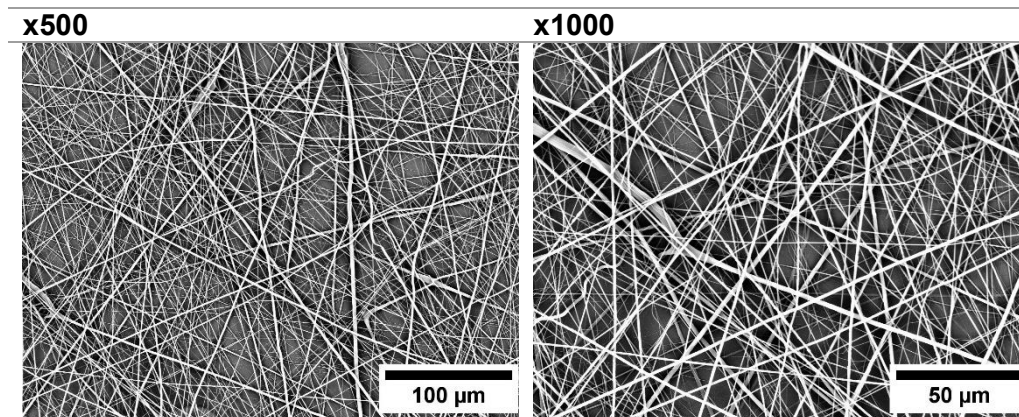


ABB. 1: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER UNBESIEDELTEN PCL NanoECM-PLATTENBÖDEN IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN. WILLKÜRlich AUSGERICHTETE FASERN ERKENNBAR, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

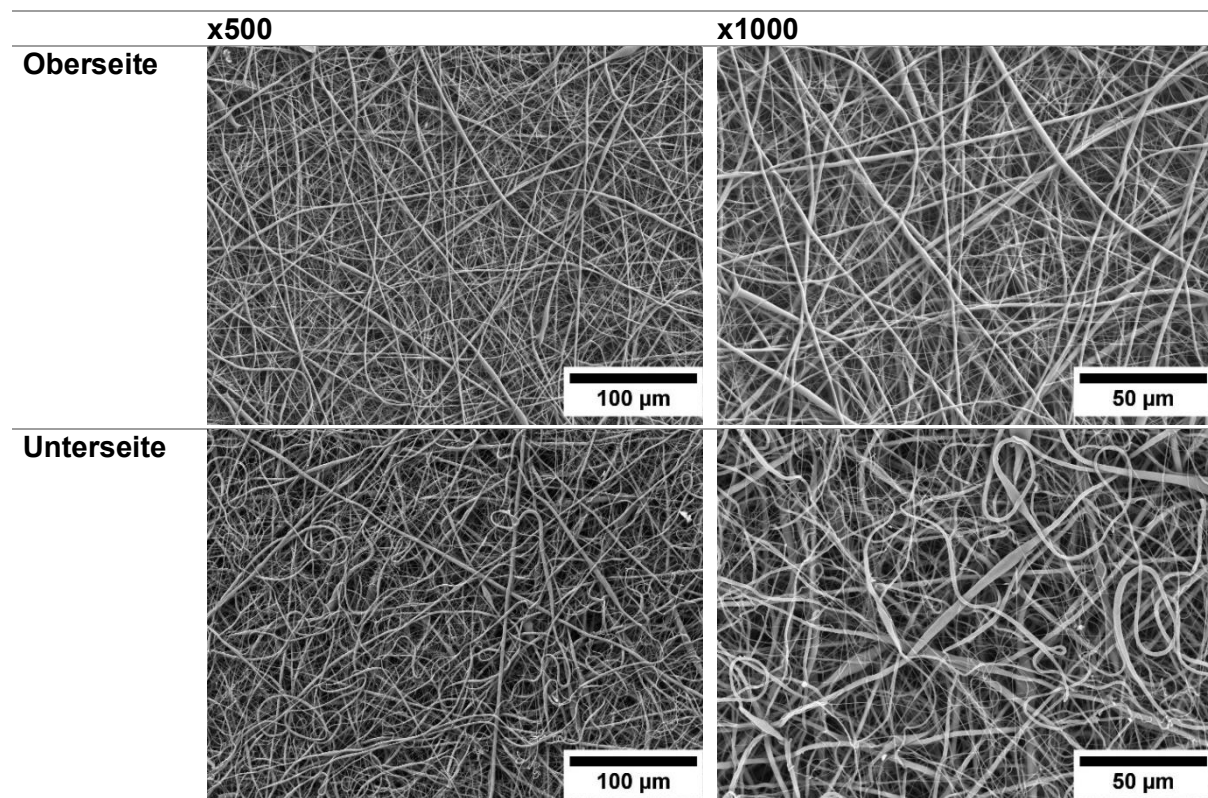


ABB. 2: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER UNBESIEDELTEN GEWEBESTÜCKE IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN VON BEIDEN SEITEN. WILLKÜRlich AUSGERICHTETE FASERN ERKENNBAR, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

2.1.4 ZELLEN

Zellen	Hersteller
Porcine mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark	Cell Biologics, Inc, Chicago, IL, USA; LOT: F011918W3

2.1.5 LABORGERÄTE, UTENSILIEN UND SOFTWARE

Laborgroßgeräte	Hersteller
Axio Observer mit ApoTome.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Cellavista®	Synentec GmbH, Elmshorn, Deutschland
Gefrierschrank -30	Kryotec, Hamburg, Deutschland
Hochvakuum Sputtergerät Leica EM SCD500	Leica, Wetzlar, Deutschland
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühlschrank Bauknecht	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank Liebherr med line 4°C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank Liebherr no frost 4°C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank Liebherr profi line 4°C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Labor-/Reagenzglasschüttler/Vortexer VK2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Laborschüttler MaxQ 2000 CO ₂ Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikroskop Zeiss ID 03	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
NyOne® Image Cytometer	Synentec GmbH, Elmshorn, Deutschland
Prüfmaschine zwickiLine Z0.5	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop TM3000 Table-Top Scanning Electron Microscope	Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank Messer Chronos	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kleingeräte	Hersteller
Duran® Glasflaschen verschiedene Größen	DWK LifeScience, Mainz, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Pinzetten anatomisch, autoklaviert	aus Beständen des Uniklinikums Schleswig-Holstein Kiel
Pinzetten chirurgisch, autoklaviert	aus Beständen des Uniklinikums Schleswig-Holstein Kiel
Pipetten Research® (Plus) 0,5-10, 10-100, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Stiftprobenhalter für Rasterelektronenmikroskop (REM), Ø 12/25 mm	PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schere, autoklaviert	aus Beständen des Uniklinikums Schleswig-Holstein Kiel

Software	Hersteller
FIJI / ImageJ	Wayne Rasband/NIH, USA
Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism V8.0.1	GraphPad Software, Boston, MA, USA
SPSS Statistics	IBM, Armonk, NY, USA
testXpert II V3.71	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland
TM3000-Software für REM	Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan
YT Software	Synentec GmbH, Elmshorn, Germany
ZEN 3.0 (ZEN pro) Mikroskopsoftware	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Zotero	Corporation for Digital Scholarship, Vienna, VA, USA

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLKULTURBEDINGUNGEN

Alle Arbeitsschritte erfolgen, wenn nicht anders beschrieben, unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank und bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert (84,85).

2.2.2 ZELLKULTUR

Die porcinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (pMSCs) wurden in MSC-Medium kultiviert (84). Das Volumen kann Tab. 1 entnommen werden. Um schädliche Stoffwechselprodukte zu entfernen und neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen, wurde das MSC-Medium zweimal wöchentlich gewechselt.

TAB. 1: VOLUMEN DES MEDIUMS BEI UNTERSCHIEDLICHEN WELL-PLATTEN UND WELLGRÖßEN

<i>Plattenart</i>	<i>Volumen pro Well</i>
6-Well-Platte	3 ml
12-Well-Platte	2 ml
24-Well-Platte	1 ml

2.2.3 ABLÖSUNG DER ZELLEN

Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro Well für 5 min bei 37°C gelöst. Die Ablösung wurde mikroskopisch überprüft und die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 ml MSC-Medium pro Well gehemmt. Zusätzlich zur enzymatischen Ablösung wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen von den Wellböden gelöst und anschließend gesammelt in eine 50 ml Röhre überführt. Bei einer voll besiedelten 6-Well-Platte ergab dies ein Flüssigkeitsvolumen von 12 ml.

2.2.4 ZENTRIFUGATION UND RESUSPENSION

Die Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 300 x g. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in entsprechendem Medium gelöst.

2.2.5 SUBKULTIVIERUNG

Die Zellen wurden wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml MSC-Medium pro neuem Well gelöst. Die in MSC-Medium suspendierten Zellen wurden auf die neuen Wells verteilt, indem je ein Milliliter der Zellsuspension auf ein Well gegeben wurde. Anschließend wurde das fehlende Mediumvolumen (entsprechend Tab. 1) aufgefüllt und die Zellen wieder bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurden nicht adhärente Zellen durch vorsichtiges Spülen mit PBS entfernt und frisches MSC-Medium zugegeben.

2.2.6 EINFRIEREN

Die Zellen wurden aus mindestens zu 80 % konfluenten Wells, wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben abgelöst, und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Cryo-Lösung resuspendiert. Pro Well einer 6-Well Platte wurde ein Milliliter der Lösung verwendet und in ein Cryotube überführt. Die Cryotubes wurden erst für 24 h bei -80°C gekühlt und schließlich entsprechend des Protokolls im Stickstofftank bei -180°C gelagert (85).

2.2.7 AUFTAUEN

Die eingefrorenen Cryotubes wurden im Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C so weit erwärmt, bis nur noch ein gefrorener Kern enthalten war. Anschließend wurden die Zellen zügig in eine 50 ml Röhre überführt. Ein Cryotube wurde mit 1 ml MSC-Medium nachgespült und die Zell-Lösung langsam mit insgesamt 10 ml 37°C warmem MSC-Medium verdünnt. Nach Zentrifugation bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 3 ml 37°C warmem MSC-Medium gelöst. Die gesamten Zellen wurden auf ein Well einer unbehandelten Standard 6-Well-Platte gebracht und kultiviert.

2.2.8 ZELLZÄHLUNG

Die Zellen wurden wie in 2.2.3 beschrieben abgelöst. 20 µl der Zellen wurden für die Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer verwendet. Die Anzahl der Zellen in dem entsprechenden Volumen ergab sich durch folgende Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl in 16x16 Quadrat}}{4} \times 10 \times \text{Flüssigkeitsmenge } [\mu\text{l}]$$

2.2.9 ZELLFÄRBUNGEN

Vor der Färbung der Zellen wurden die Wells zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen.

2.2.9.1 HOECHST UND CELLTRACKER RED

Die Proben wurden mit der Ziegenserumlösung für 20 min bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, an denen der Farbstoff Hoechst binden würde. Nach Abnehmen der Ziegenserumlösung wurden die Zellen mit 1 ml Hoechst-CellTracker Red-Färbelösung pro Well für 30 min bei 37°C gefärbt. Die optimale Dosierung wurde zu Beginn der Experimente evaluiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS gespült.

2.2.9.2 CELLTOX GREEN

Zur Färbung der toten Zellen wurden die Wells mit 0,5 ml CellTox Green-Färbelösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach Abnehmen der Flüssigkeit wurden die Proben dreimal mit 0,5 ml PBS pro Well gespült (84).

2.2.10 FIXIERUNG FÜR DAS RASTERELEKTRONENMIKROSKOP

Für eine Analyse am Rasterelektronenmikroskop wurden die Proben zweimal mit PBS gespült und für 2 h bei Raumtemperatur mit Roti®-Histofix 10 % Lösung inkubiert. Danach wurden die Plattenböden ausgeschnitten und in neuen 6-Well-Platten zuerst 5 min mit je 3 ml PBS und anschließend mit frischem PBS noch mal für 10 min bei 4°C und bei 90 Umdrehungen pro Minute geschwenkt. Als nächstes wurden die Proben zum Entwässern erst für 5 min, dann für 10 min mit 30 % Ethanol in doppelt destilliertem Wasser inkubiert. Auf gleiche Weise erfolgte eine Inkubation mit 50 % Ethanol und daraufhin mit 70 % Ethanol, ebenfalls gemischt mit doppelt destilliertem Wasser. Hier konnten die Proben in 3 ml 70 % Ethanol bei 4°C für maximal drei Wochen zwischengelagert werden. Die nächsten Entwässerungsschritte mit 80 %, 90 %, 95 % und 99,9 % Ethanol bei 4°C wurden nach dem vorherigen Schema durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 15 min in 33 % HMDS verdünnt mit 99,9 % Ethanol, für 15 min in 66 % HMDS in 99,9 % Ethanol und zweimal für 15 min in 100 % HMDS bei 4°C geschwenkt. Das HMDS wurde nach dem letzten Schritt abgenommen und die Platten wurden

offen unter der Sicherheitswerkbank stehen gelassen, bis die Proben trocken waren. Nun wurden die Proben auf Stiftprobentellern befestigt und von der Arbeitsgruppe Funktionelle Morphologie und Biomechanik von Prof. Dr. Gorb an der CAU freundlicherweise mit einer Gold- und Palladium-Schicht zur Verbesserung der Leitfähigkeit besputtert (84).

2.2.11 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Die entsprechend 2.2.10 fixierten Proben wurden an einem Hitachi TM 3000 Elektronenmikroskop am Zoologischen Institut der CAU Kiel bei 15 kV Spannung betrachtet und die Ergebnisse durch Aufnahmen dokumentiert (84).

2.2.12 VERSUCHE MIT 24-WELL PCL NANOECM-PLATTEN

Hier wird das Verfahren beschrieben, welches für die Versuche mit den 24-Well PCL NanoECM-Platten von Nanofiber Solutions angewendet wurde.

2.2.12.1 VORBEREITUNG UND BESCHICHTUNG

Die Vorbereitung der 24-Well PCL NanoECM-Platten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Dr. Mariano Viapiano (86). Nachdem alle Wells zweimal mit je 0,5 ml PBS (20°C) gewaschen wurden und wieder abgetrocknet waren, wurden sie mit jeweils 0,5 ml MSC-Medium bei 37°C für 30 min inkubiert.

Anschließend wurde mit der Beschichtung der Fasern mit Gelatine und MatriGel® begonnen (84). Für die Beschichtung mit MatriGel® wurde in den entsprechenden Wells (Abb. 3) das MSC-Medium abgenommen und 0,5 ml kalte MatriGel®-Beschichtungslösung (10°C) pro Well verteilt. Die Platte wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Für die Beschichtung mit Gelatine wurde anschließend in den entsprechenden Wells (Abb. 3) das MSC-Medium abgenommen und 0,5 ml 37°C warme Gelatine 0,1 % verteilt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach frühestens zwei Stunden wurde die Gelatine abgenommen und die Platte blieb offen unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur, bis die mit Gelatine beschichteten Wells getrocknet waren. Schlussendlich wurde aus jedem Well die Flüssigkeit abgenommen und zwei Mal mit je 0,5 ml PBS gespült.

Die Wells aus Spalte 6 in Reihe A bis C wurden nicht besiedelt, aber beschichtet. Sie dienten als Leerprobe für die Fluoreszenzmikroskopie, um eventuelle Messfehler in der automatischen Zellzählung der Fluoreszenzmikroskope auszugleichen.

Reihe D wurde für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendet. Hier waren D2, D4 und D6 die Leerproben für das vorherige Well. D1 und 2 waren unbeschichtet. D3 und 4 mit Gelatine beschichtet und D5 und 6 mit MatriGel® beschichtet.

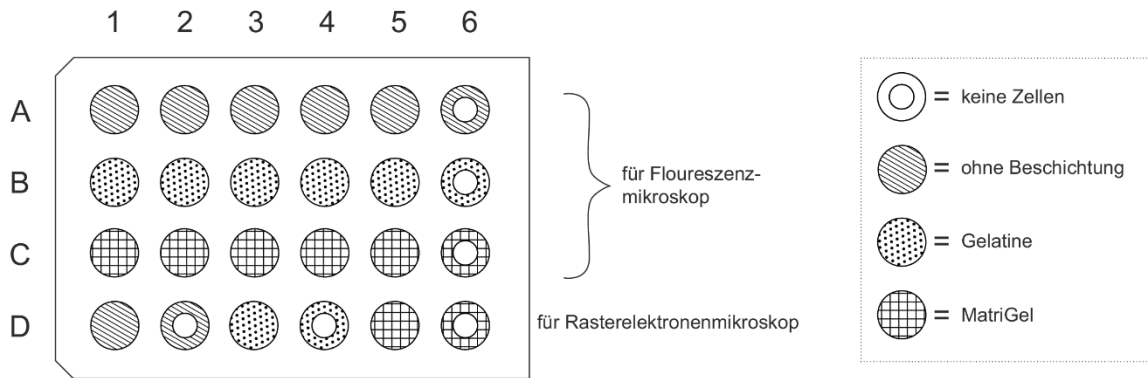


ABB. 3: VERSUCHSAUFBAU 24-WELL PCL NanoECM-PLATTE. REIHE A-C FÜR VERSUCHE AM FLUORESZENZMIKROSKOP, REIHE D FÜR VERSUCHE AM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP, REIHE B UND D 3+4 MIT GELATINE BESCHICHTET, REIHE B UND D 5+6 MIT MATRIGEL® BESCHICHTET, SPALTE 6, D2, 4, 6 ALS LEERPROBEN, UNBESIEDELT.

2.2.12.2 STATISCHE BESIEDELUNG MIT MSCs

Die pMSCs wurden sieben Tage vor der statischen Besiedelung wie unter 2.2.7 und 2.2.2 beschrieben aufgetaut und kultiviert. Die Besiedelung der PCL-Platten erfolgte bei Konfluenz der Zellen mit einer Dichte von ungefähr $2,6 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ in Passage 5–7 (84). Pro Well wurden 50.000 Zellen eingesetzt. Die benötigte Zellmenge wurde zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 0,5 ml warmem MSC-Medium pro Well gelöst. In die entsprechenden Wells der 24-Well PCL NanoECM-Platten (Abb. 3) wurden 0,5 ml Zelllösung gegeben und mit 0,5 ml MSC-Medium aufgefüllt. In die Wells ohne Zellen wurde 1 ml MSC-Medium gegeben. Die Kultivierung der Platten erfolgte statisch bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.2.12.3 IMAGING

Das Zellwachstum wurde sowohl mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops als auch eines Rasterelektronenmikroskops (REM) beurteilt.

Die Zellen in den Reihen A bis C wurden mit drei Fluoreszenz-Farbstoffen entsprechend 2.2.9 markiert. Jedes Well wurde entsprechend 2.2.9 mit Hoechst-CellTracker Red-Färbelösung und CellTox-Färbelösung gefärbt. Für die Messung wurde auf jedes Well 0,5 ml PBS gegeben (84). Die Messung am NyOne® oder Cellavista® Image Cytometer erfolgten im Programm *Virtual Cytoplasm* (2F). Hier gibt es 4 Kanäle:

TAB. 2: EXZITATIONS- UND EMISSIONSSPEKTREN DER GEWÄHLTEN KANÄLE AM IMAGE CYTOMETER

	<i>Exzitation</i>	<i>Emission</i>
<i>brightfield</i>	brightfield	brightfield
<i>Nuclei (Hoechst 33342)</i>	UV (352–402 nm)	blue (430–475 nm)
<i>F1 (CellTracker Red CMTPX)</i>	lime (542–582 nm)	red-LP (593 nm–LP)
<i>F2 (CellTox™ Green)</i>	blue (461–489 nm)	green (508–555 nm)

Die Geräte sind in der Messung der Emissionen gleichwertig zu betrachten. Als Unterschied lässt sich beim Cellavista® neben dem Exzitations- und Emissionsmenü auch noch ein dichroitischer oder Interferenzfilter verwenden, welches allerdings auf die gleichen Wellenlängen wie das Exzitationsspektrum eingestellt wird. Im Brightfield-Kanal wird für den Filter „blue“ (461–489 nm) eingestellt.

Es musste darauf geachtet werden, dass sich die Exzitations- und Emissionsspektren nicht überschneiden.

Die Anzahl aller Zellen, die sowohl mit Hoechst als auch mit CellTracker Red CMTPX, aber nicht mit CellTox Green gefärbt waren, ergab die Menge an lebenden Zellen. Bei positiver Färbung im Kanal F2 (CellTox Green) wurden diese als tote Zellen gezählt. Durch Artefakte aufgrund der PCL-Fasern wurde pro Messung ein unbesiedeltes Well analysiert. Die Werte für „lebende“ und „tote“ Zellen in diesem Well wurden als Leerwert von den Zellmengen der anderen Messungen abgezogen (84).

Der prozentuale Anteil der toten Zellen je Well wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% F2 = \frac{F2 +}{TCpn + F2 +}$$

Hierbei ist F2 + die Anzahl der toten Zellen eines Wells und TCpn die Menge der Hoechst und CellTracker Red gefärbten Zellen (keine CellTox Green-Färbung).

In mehreren der verwendeten 24-Well PCL NanoECM-Platten zeigten sich veränderte Faserbeschaffenheiten in Form von Verdickungen (Abb. 4, Abb. 5). Dies stellte ein Problem dar, da sich die PCL-Fasern auch leicht mit Hoechst und CellTracker Red anfärbten. Am NyOne® und Cellavista® wurden diese Materialverdickungen als Zelle gewertet. Dadurch entstanden falschhohe Werte von 698 bis 3.507 „Zellen“ pro Well als Zellmenge in den nicht besiedelten Wells, welche als Leerwert abgezogen wurden. Normale Werte aus Messungen makelloser Bereiche betrugen 0 bis 83 „Zellen“ pro Well. Demnach sind die ausgewerteten Zellmengen für die entsprechenden Messungen etwas geringer, als sie es unter idealen Versuchsbedingungen wären.

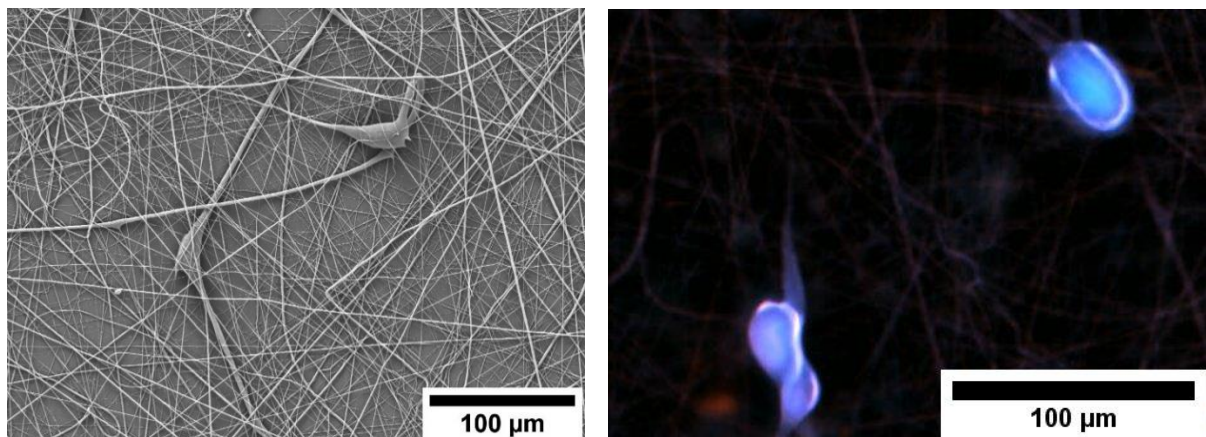


ABB. 5: MATERIALFEHLER. REM- (LINKS) UND FLUORESZENZAUFNAHME (RECHTS) VON MATERIALFEHLERN EINER UNBESIEDELTEN PCL NanoECM-PLATTE; BEI DER REM-AUFNAHME IM RECHTEN OBEREN QUADRANTEN UND MITTIG LINKS.

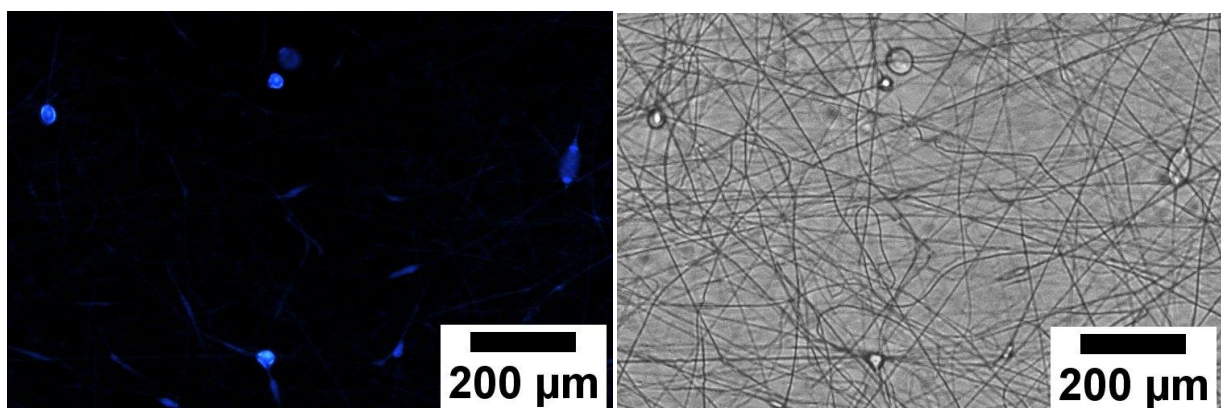


ABB. 4: MATERIALFEHLER. FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON MATERIALFEHLERN EINER UNBESIEDELTEN PCL NanoECM-PLATTE, LINKS: HOECHST, RECHTS: BRIGHTFIELD.

Für die elektronenmikroskopische Aufnahme von Reihe D wurden die Wells entsprechend 2.2.10 zwei Mal mit je 0,5 ml PBS gespült. Dann wurde 1 ml Roti®-Histofix 10 % pro Well hinzugegeben. Nach erfolgreichem Imaging am NyOne®/Cellavista® wurden alle Flüssigkeiten verworfen und die Böden der Wells aus Reihe D mit einem Skalpell vorsichtig entlang des Randes herausgeschnitten. Jeder Boden kam in ein separates Well einer unbehandelten Standard 6-Well-Platte und wurden entsprechend Methode 2.2.10 weiter behandelt.

2.2.13 VERSUCHE MIT PCL-GEWEBESTÜCKEN

Hier wird das Verfahren beschrieben, welches für die Versuche mit den 700 nm PCL NanoECM-Geweben von Nanofiber Solutions angewendet wurde. Die Versuche erfolgten auf Grundlage der Versuchsergebnisse der PCL-Platten-Besiedelung.

2.2.13.1 VORBEREITUNG

Das PCL-Gewebe wurde in Stücke mit den Maßen 5 x 15 mm zugeschnitten. Je ein Stück wurde in einem Well einer 12-Well-Platte mit 2 ml MSC-Medium für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das MSC-Mediums abgenommen (84).

2.2.13.2 BESIEDELUNG MIT MSCs

Die Besiedelung erfolgte mit $1,9 \cdot 10^4$ Zellen in Passage 6 auf Seite A (entspricht ca. $2,6 \cdot 10^4$ Zellen/cm²). Die gewünschte Zellmenge wurde in 10 µl MSC-Medium pro Well gelöst und mit Hilfe einer Pipette auf das Material getropft. So wurden die PCL-Stücke mit den Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor 2 ml MSC-Medium hinzugeben wurden. An Tag 1 wurden die PCL-Gewebestücke mit einer sterilen Pinzette gewendet, das Medium wurde abgenommen und auch Seite B wurde, wie oben beschrieben, besiedelt (84). Das MSC-Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.2.13.3 FLUORESZENZ- UND RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Analyse am Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskop erfolgte an Tag 7, 14 und 21. Zur Darstellung des Wachstums der Zellen in verschiedenen Ebenen auf dem zugeschnittenen PCL-Material wurden die Zellen entsprechend 2.2.9.1 gefärbt. Pro Well einer 12-well Platte wurden je 2 ml der Ziegensersumlösung und 2 ml DMEM + 0,66 µl Hoechst verwendet. Es wurde auf Färbung mit CellTox Green™ verzichtet, da der Anteil an toten Zellen bereits bei den Platten bestimmt wurde. Nach der Färbung wurden die PCL-Stücke in Fluoromount-Medium auf die Objektträger aufgebracht. Das Deckglas wurde blasenfrei aufgelegt. Mithilfe des Zeiss Axio Observers wurden die angefärbten Zellen dargestellt. Die Z-Stack-Funktion ermöglichte es Bilderserien eines gewählten Bereichs in verschiedenen Fokushöhen in einem gewünschten Abstand aufzunehmen. Hierdurch wurden Zellen in verschiedenen Ebenen erkennbar. Für diese Versuchsreihe wurde ein Abstand zwischen den Bildern von 1 µm gewählt. Die Vorbereitung für das REM und die Aufnahmen daran erfolgten entsprechend 2.2.10 und 2.2.11. Es wurden je 2 ml PBS und Roti®-Histofix 10 % Lösung pro Well einer 12-Well-Platte verwendet. Die Gewebestücke wurden vor der Befestigung auf dem Stiftprobenhalter mittig durchgeschnitten. Die eine Hälfte wurde mit Seite A nach oben fixiert, die andere mit Seite B. Dies wurde entsprechend markiert. Die Seite, welche an Tag 1 besiedelt wurde und demnach in der Regel nach oben gezeigt hat (i.d.R. Seite B), wurde als Oberseite bezeichnet. Die andere Seite, welche an Tag 0 besiedelt wurde und nach dem Drehen an Tag 1 zum Plattenboden gezeigt hat, wurde als Unterseite bezeichnet.

2.2.13.4 ZUGTESTUNG

Die besiedelten PCL-Stücke wurden an Tag 21 an einer Materialprüfmaschine mechanischen Tests unterzogen. Dafür wurden die 5 x 15 mm-Proben direkt aus dem MSC-Medium genommen und feucht in Längsrichtung so eingespannt, dass sich auf jeder Seite 5 mm der Enden in den Halteklemmen befand. Dazwischen befand sich 5 mm besiedeltes PCL-Material, das getestet wurde (vgl. Abb. 6). Die Halteklemmen hatten vor Beginn ebenfalls einen Abstand von 5 mm zueinander.



ABB. 6: ZUGTESTUNG EINES PCL-GEWEBESTÜCKS. PCL-GEWEBESTÜCK EINGESpanNT IN DER MATERIALPRÜF-MASCHINE WÄHREND DER TESTUNG, PCL = POLY-ε-CAPROLACTONE.

Es erfolgten einfache und zyklische Zugtests. Die Vorspannung wurde jeweils auf 0,2 N festgelegt. Die Prüfgeschwindigkeit lag bei 5 mm/min, die Last bei 5 kN. Bei den einfachen Zugtests wurde das E-Modul, die maximale Zugfestigkeit als Maximalkraft $F_{\max}$ und die Dehnungslänge bei $F_{\max}$ in Prozent ermittelt. Bei den zyklischen Tests wurde die Zugkraft in 0,05 Newton-Schritten in 9 Zyklen von 0,05 N auf 0,45 N erhöht. Die $F_{\max}$ von 0,45 N wurde auf Grundlage der Ergebnisse aus den Bruchpunkttestungen festgelegt. Zwischen den Zugbelastungen lag jeweils eine Entlastungsphase auf 0,01 N. Die zyklischen Zugtestungen ergaben die Dehnungslängen bei $F_{\max}$ von 0,45 N und die Belastungs- und Entlastungskurven.

2.2.14 STATISTISCHE ANALYSE

Die Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwert/Median/Interquartilsabstand (IQR) angegeben.

Die statistische Analyse erfolgte mithilfe von Graphpad Prism und SPSS. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Anschließend wurde zur Prüfung der Unterschiede zwischen den Zellzahlen der Platten der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei statistisch relevanten Unterschieden im Kruskal-Wallis-Test wurde post-hoc ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um zu differenzieren, zwischen welchen Gruppen der Unterschied bestand. Bei den Daten aus den einfachen und zyklischen Zugtests wurde das besiedelte PCL-Gewebe aufgrund der geringen Stichprobengröße mittels des Mann-Whitney-U-Tests mit dem unbesiedelten Gewebe verglichen sowie mit Daten aus Zugtestungen mit nativen porcinen Pulmonalklappensegeln, welche radial und zirkumferentiell getestet wurden. Diese Daten stammen aus unveröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe.

Ein Unterschied wurde als signifikant gewertet bei einem p-Wert von kleiner 0,05.

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von porcinen MSCs auf PCL-Plattenböden und dickerem Gewebe untersucht. Dabei wurden nach 1, 7, 14 und 21 Tagen die qualitativen und quantitativen Veränderungen am REM und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit Zellzählfunktion beobachtet. Zum anderen wurde zugeschnittenes, über 21 Tage besiedeltes PCL-Gewebe auf seine mechanischen Eigenschaften geprüft und an einer Materialprüfmaschine analysiert. Die PCL-Stücke wurden ebenfalls nach 7, 14 und 21 Tagen im REM und Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.1 URSPRUNG DER PORCINEN MSCs

Laut Hersteller stammten die verwendeten porcinen MSCs aus dem Knochenmark der Tibia. Sie wurden 7–15 Tage kultiviert, dann expandiert und eingefroren. Sie wurden in Passage 1 gefroren versendet. Die Phiolen, in denen sie sich befanden, enthielten 10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden negativ getestet auf Bakterien, Mykoplasmen, Pilze und Hefen. Die Expression von CD44 und CD29 wurde getestet (85).

3.2 MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PCL-MATERIALIEN

Sowohl die Fasern der PCL NanoECM-Platten als auch die PCL-Gewebestücke waren willkürlich angeordnet. Allerdings ließ sich nur bei den PCL-Gewebestücken eine dreidimensionale Architektur ähnlich der Extrazellulärmatrix erkennen (102, Abb. 1, Abb. 2). Zudem zeigten sich in einer Charge unregelmäßige Verdickungen der PCL-Fasern, welche sowohl im REM als auch unter dem Fluoreszenzmikroskop Cellavista® beziehungsweise NyOne® erkennbar war (Abb. 4, Abb. 5).

3.3 ZELLWACHSTUM 24-Well PCL NANOECM-PLATTEN

3.3.1 UNBESCHICHTETE PLATTEN

Bei den 24-Well PCL NanoECM-Platten ohne Beschichtung zeigte sich in der elektronenmikroskopischen Betrachtung während der 21-tägigen Besiedelung eine immer dichter werdende Bewachung des PCL-Materials. An Tag 1 waren verstreut vereinzelte Zellen zu sehen. Diese wuchsen mit ihren Ausläufern bereits entlang der PCL-Fasern. An Tag 7 zeigten sich bereits erste Zellanhäufungen mit andererseits noch größeren Lücken dazwischen. An Tag 14 waren große Bereiche bereits komplett von Zellen bewachsen mit nur noch kleinen Abständen

zwischen den MSCs. Die Zellen orientierten sich mehr und mehr in eine Richtung und parallel zueinander, sodass es nur noch kleinere nicht bewachsene Bereiche gab. An Tag 21 zeigte sich eine nahezu vollständig geschlossene Zelldecke. Die parallele Anordnung war an diesen Proben durchgängig zu erkennen. Kleinere Lücken der Zelldecke wurden als Artefakte im Rahmen der Probenverarbeitung gewertet (Abb. 7).

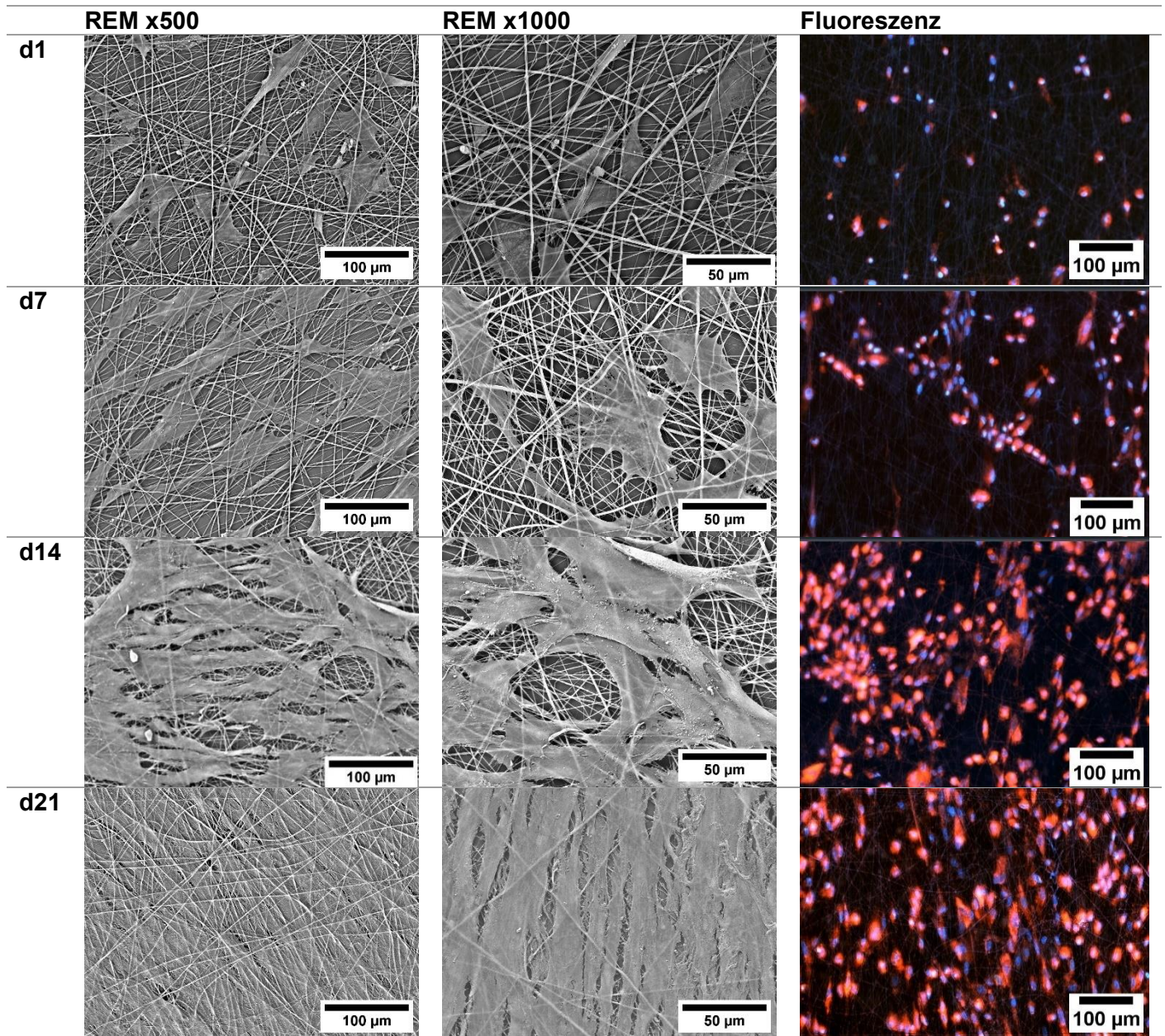


ABB. 7: RASTER- UND FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER UNBESCHICHTETEN BESIEDELTEN PCL-PLATTEN AN TAG 1, 7, 14 UND 21 IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN AM REM; FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN MIT DREI FARBSTOFFEN: BLAU = HOECHST = ZELLKERNE, ROT = CELLTRACKER™ RED = ZELLE, GRÜN = CELLTOX™ GREEN = TOTE ZELLEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF ZEIGT SICH EINE IMMER DICHTER WERDENDE ZELLDECKE, d = TAG, PCL = POLY-ε-CAPROLACTONE, REM = RASTERELEKTRONENMIKROSKOP.

Im Verlauf der 21 Tage wurde der Anteil der toten Zellen immer geringer (Abb. 10, Abb. 11, (Fluoreszenzmikroskopie)). In den REM-Aufnahmen waren keine toten Zellen zu sehen.

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Da die Daten zum Großteil nicht normalverteilt waren (mit $p < 0,05$), wurden nachfolgend nicht parametrische Tests verwendet und jeweils Mittelwert, Median sowie der Interquartilsabstand (IQR) angegeben (siehe auch Tab. 3).

An **Tag 1** wurden im Mittel 18.627, im Median 17.748, IQR 3.770 Zellen/cm² ermittelt. Die durchschnittliche Menge an CellTox Green™-positiven und damit toten Zellen lag bei 941,1/cm², die mediane Menge bei 945/cm², IQR 470,2/cm² und der prozentuale Anteil an allen Zellen im Durchschnitt bei 4,99 %, im Median bei 4,92 %, IQR 2,22 %. An **Tag 7** gab es im Durchschnitt 39.251 Zellen/cm², im Median 40.210 Zellen/cm², IQR 10.437 Zellen/cm². Es wurden im Mittel 1.362 CellTox Green™-positive Zellen/cm², im Median 1.338 Zellen, IQR 649 gezählt (3,51/3,26/2,06 %). An **Tag 14** lag die Zellmenge pro Quadratzentimeter bei 55.556/55.920/7.396 (Mittelwert/Median/IQR). Es wurden 978/996,5/692,3 tote Zellen/cm², detektiert (1,75/1,82/1,52 %). An **Tag 21** lag der Mittelwert bei 77.847, der Median bei 84.065 und der IQR bei 29.335 Zellen/cm². Für die toten Zellen ergaben sich pro Quadratzentimeter Zellmengen von 703,1/341,4/1.046,7 sowie prozentual 0,91/0,44/1,01 % (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10).

Im Verlauf der 21 Tage wurde der Anteil der toten Zellen immer geringer (Abb. 7 (Floureszenzmikroskopie), Abb. 9). In den REM-Aufnahmen waren keine toten Zellen zu sehen.

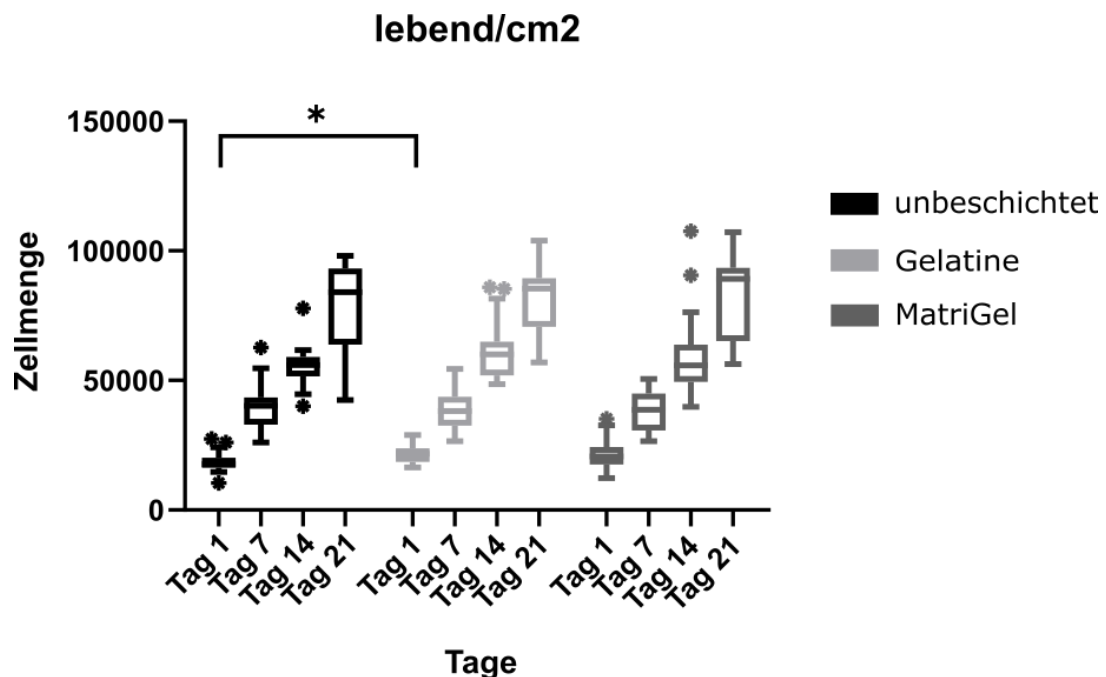


ABB. 8: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER ZELLMENGEN DER LEBENDEN ZELLEN/CM² AUF DEN PCL-PLATTEN NACH TAGEN UND BESCHICHTUNGEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF ZEIGTEN SICH IMMER MEHR ZELLEN; *: $p < 0,05$, PCL = POLY-E-CAPROLACTONE

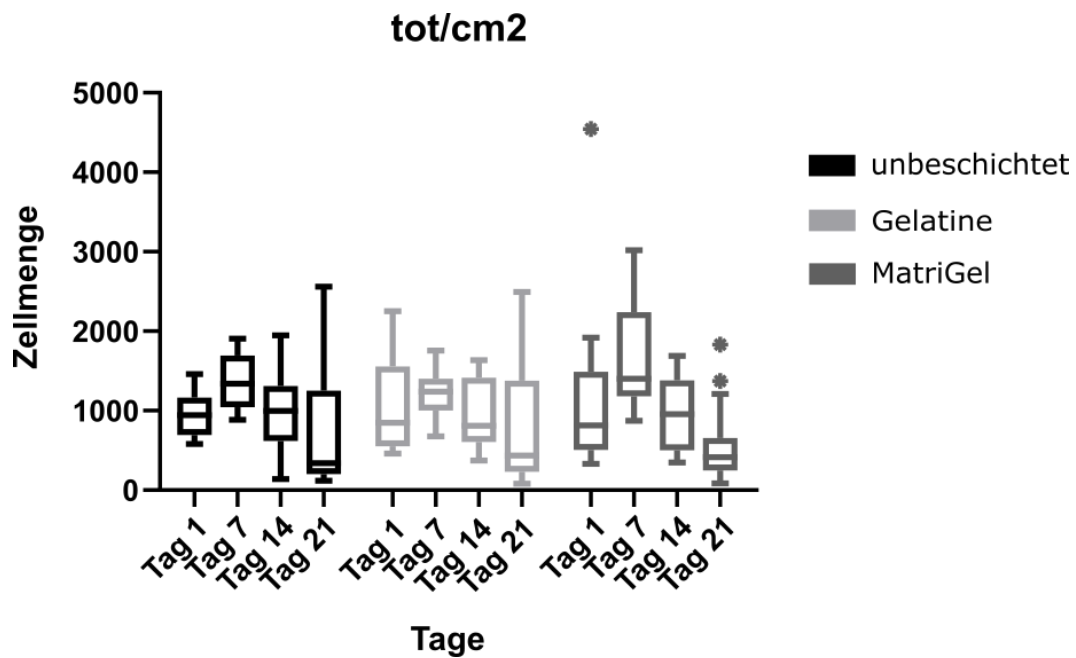


ABB. 9: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER ZELLMENGEN DER TOTEN ZELLEN/CM² AUF DEN PCL-PLATTEN NACH TAGEN UND BESCHICHTUNGEN. ES ZEIGT SICH EIN LEICHTER ABWÄRTSTREND IM ZEITLICHEN VERLAUF, ALLERDINGS MIT GROßEN ABWEICHUNGEN, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

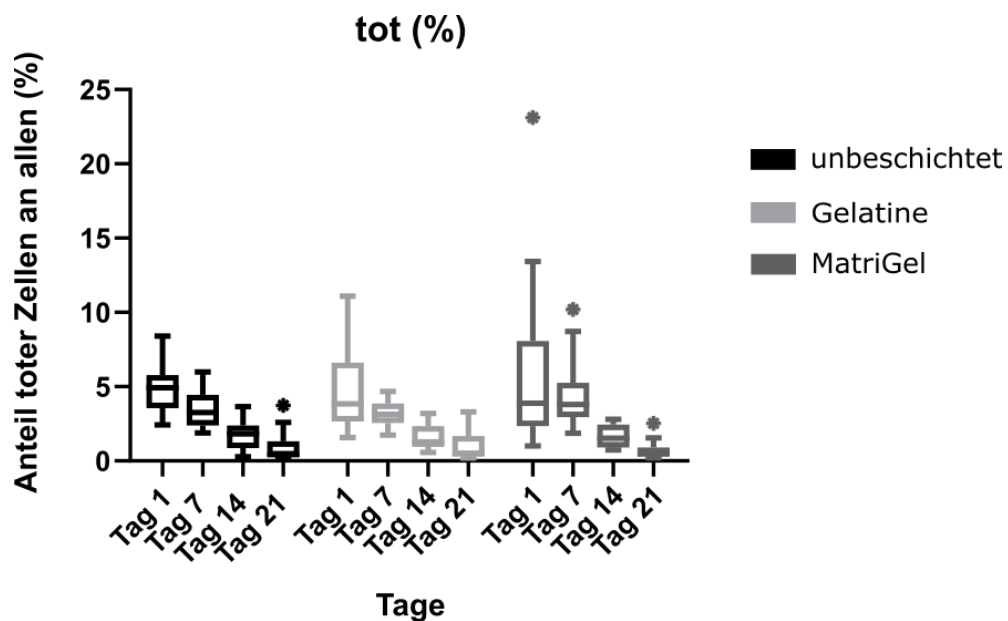


ABB. 10: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER PROZENTUALEN ANTEILE AN TOTEN ZELLEN AN DER GESAMTHEIT ALLER ZELLEN AUF DEN PCL-PLATTEN NACH TAGEN UND BESCHICHTUNGEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF PROZENTUAL IMMER WENIGER TOTE ZELLEN, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

3.3.2 VERGLEICH UNBESCHICHTETE UND BESCHICHTETE PLATTEN

Bei den PCL NanoECM-Platten, welche mit Gelatine (Abb. 11) oder MatriGel® (Abb. 12) beschichtet waren, zeigte sich ebenfalls eine immer dichter werdende Bewachung des PCL-Materials.

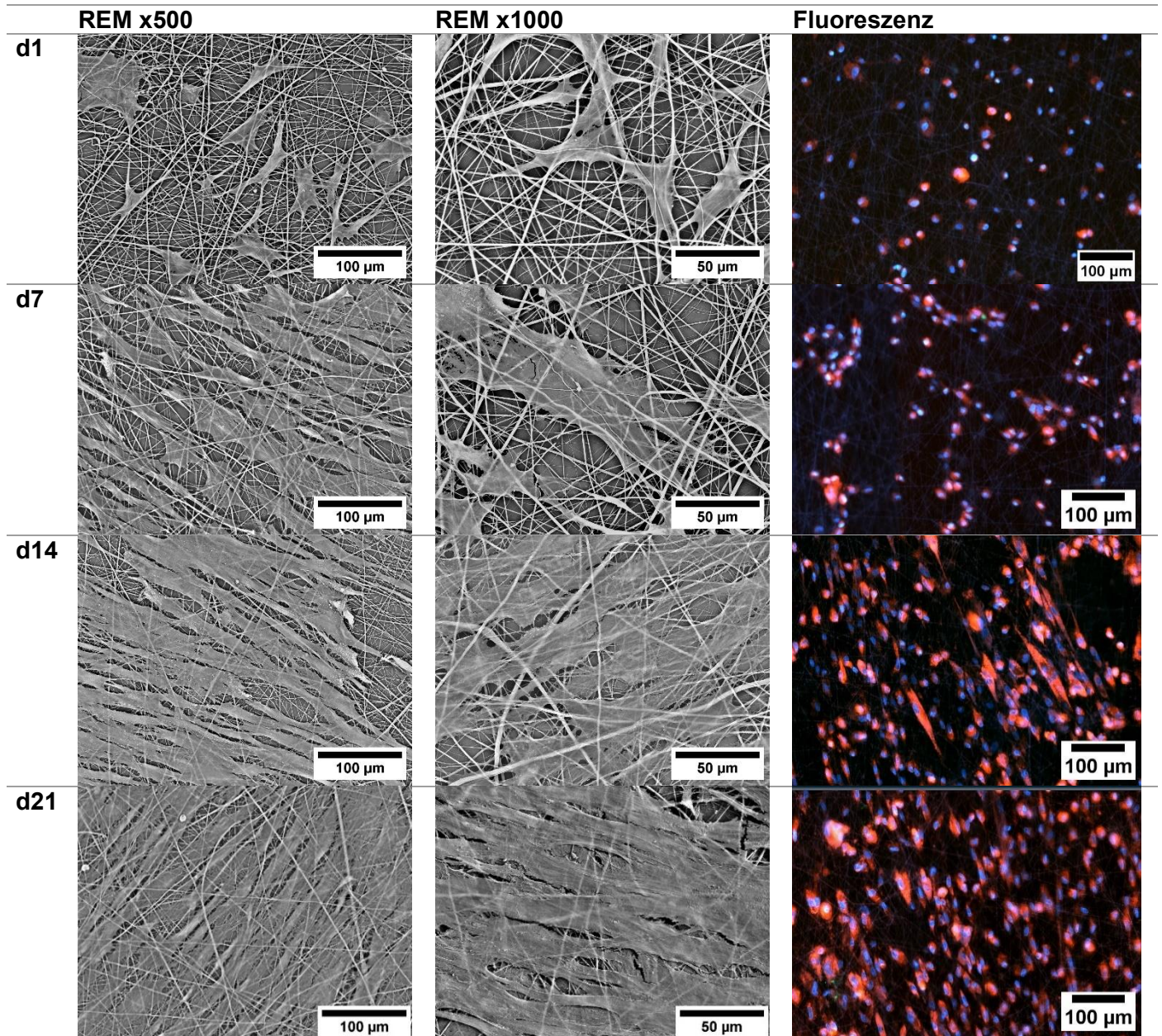


ABB. 11: RASTER- UND FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER MIT GELATINE BESCHICHTETEN PCL-PLATTEN AN TAG 1, 7, 14 UND 21 IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN AM REM; FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN MIT DREI FARBSTOFFEN: BLAU = HOECHST = ZELLKERNE, ROT = CELLTRACKER™ RED = ZELLE, GRÜN = CELLTOX™ GREEN = TOTE ZELLEN. IMMER DICHTER WERDENDE ZELLDECKE IM ZEITLICHEN VERLAUF ERKENNBAR, d = TAG, PCL = POLY-ε-CAPROLACTONE, REM = RASTERELEKTRONENMIKROSKOP.

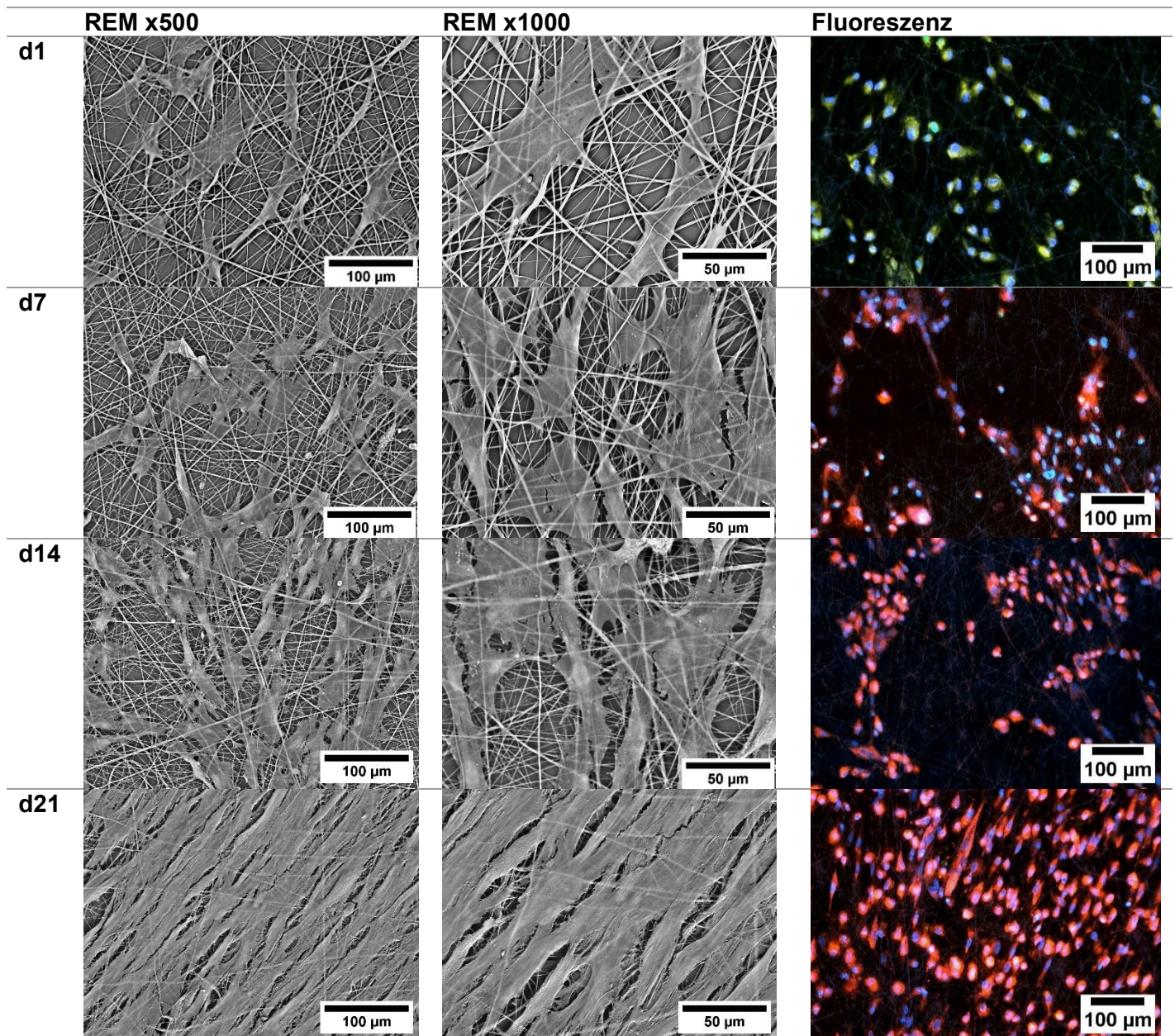


ABB. 12: RASTER- UND FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER MIT MATRIGEL® BESCHICHTETEN BESIEDEL- TEN PCL-PLATTEN AN TAG 1, 7, 14 UND 21 IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN AM REM; FLUORESZENZMIKRO- SKOPISCHE AUFNAHMEN MIT DREI FARBSTOFFEN: BLAU = HOECHST = ZELLKERNE, ROT = CELLTRACKER™ RED = ZELLE BZW. FÜR TAG 1 ZELLE = GELB, GRÜN = CELLTOX™ GREEN = TOTE ZELLEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF ZEIGT SICH EINE IMMER DICHTER WERDENDE ZELLDECKE, d = TAG, PCL = POLY-ε-CAPROLACTONE, REM = RASTERELEKTRONEN- MIKROSKOP.

In der Zellzählung am Fluoreszenzmikroskop wurden ebenfalls die Zellmengen der mit Gela- tine beschichteten und der mit MatriGel® beschichteten Platten separat untersucht. So konn- ten etwaige unterschiedliche Wachstumsverhalten erkannt werden. Pro Beschichtung und Tag wurden auch hier 20 Platten untersucht. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurden die Zellmen- gen der verschieden beschichteten Wells zum selben Messzeitpunkt verglichen.

TAB. 3: ZELLMENGEN ALLER ZELLEN UND DER TOTEN ZELLEN UNTERTEILT NACH DEN VERSCHIEDENEN BESCHICHTUNGEN AN TAG 1, 7, 14, 21 SOWIE PROZENTUALE ANTEILE DER TOTEN ZELLEN AN ALLEN ZELLEN, WERTE ANGEGEBEN NACH FOLGENDEM SCHEMA MITTELWERT/MEDIAN/INTERQUARTILSABSTAND (IQR)

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Beschichtung</i>	<i>Zellmenge insgesamt (Zellen/cm²)</i>	<i>Anzahl toter Zellen (Zellen/cm²)</i>	<i>Prozentuale Anteile toter Zellen (%)</i>
<i>Tag 1</i>	unbeschichtet	18.627/17.748/3.770	941,1/945/470,2	4,99/4,92/2,22
	Gelatine	21.601/21.734/5.310	1.053/846/1.002,8	4,82/3,85/3,96
	MatriGel®	21.573/20.607/6.671	1.149/813,1/980,8	5,8/3,89/5,72
<i>Tag 7</i>	unbeschichtet	39.251/40.210/10.437	1.362/1.338/649	3,51/3,26/2,06
	Gelatine	38.302/38.196/11.102	1.207/1.238/402	3,14/3,13/1,31
	MatriGel®	37.740/38.746/14.288	1.682/1.400/1.057	4,51/3,81/2,32
<i>Tag 14</i>	unbeschichtet	55.556/55.920/7.396	978/996,5/692,3	1,75/1,82/1,52
	Gelatine	61.497/60.076/12.966	979,6/810,9/810,1	1,63/1,29/1,4
	MatriGel®	59.470/55.807/14.281	964,8/954,7/881,2	1,66/1,53/1,54
<i>Tag 21</i>	unbeschichtet	77.847/84.065/29.335	703,1/341,4/1.046,7	0,91/0,44/1,01
	Gelatine	80.172/85.431/18.857	757,9/437,5/1.147,2	0,94/0,5/1,37
	MatriGel®	82.385/89.230/28.204	571,9/416,3/409,5	0,69/0,48/0,54

Die automatische Zellzählung ergaben an Tag 1 eine durchschnittliche bzw. mediane Zellmenge von 18.627 bzw. 17.748 Zellen/cm², IQR 3.770 Zellen/cm² für unbeschichtete Platten, 21.601 bzw. 21.734 Zellen/cm², IQR 5.310 Zellen/cm² für Gelatine-beschichtete Platten und 21.573 bzw. 20.607 Zellen/cm², IQR 6.671 Zellen/cm² für MatriGel®-beschichtete Platten. Die Menge an CellTox Green™-positiven und damit toten Zellen lag durchschnittlich bei 941,1/cm², im Median bei 945/cm², IQR 470,2/cm² bzw. durchschnittlich bei 1.053/cm², im Median bei 846/cm², IQR 1.002,8/cm² bzw. durchschnittlich bei 1.149/cm², im Median bei 813,1/cm², IQR 980,8/cm², dies entspricht im Median einem prozentualen Anteil an allen Zellen von 4,99/4,92/2,22 %, 4,82/3,85/3,96 % und 5,8/3,89/5,72 %.

An Tag 7 gab es im Durchschnitt 39.251 Zellen/cm², im Median 40.210 Zellen/cm², IQR 10.437 Zellen/cm² auf unbeschichteten Platten, 38.302/38.196/11.102 Zellen/cm² bei einer Beschichtung mit Gelatine und 37.740/38.746/14.288 Zellen/cm² bei einer Beschichtung mit Matri-Gel. Bei den entsprechenden Messungen wurden pro Quadratzentimeter 1.362/1.338/649 tote Zellen; 1.207/1.238/402 toten Zellen und 1.682/1.400/1.057 tote Zellen detektiert, was anteilig 3,51/3,26/2,06 %, 3,14/3,13/1,31 % und 4,51/3,81/2,32 % entspricht (Mittelwert/Median/IQR).

Die Mittelwerte, Mediane und IQR für Tag 14 lagen bei 55.556 Zellen/cm², 55.920 Zellen /cm² und 7.396 Zellen/cm² für unbeschichtete Platten; 61,497 Zellen/cm², 60.076 Zellen/cm² und 12.966 Zellen/cm² für Gelatine-beschichtete und 59.470 Zellen/cm², 55.807 Zellen/cm² und

14.281 Zellen/cm² für MatriGel®-beschichtete Platten. Es wurden jeweils 978/996,5/692,3 tote Zellen/cm² (unbeschichtet), 979,6/810,9/810,1 tote Zellen/cm² (Gelatine) und 964,8/954,7/881,2 tote Zellen/cm² (MatriGel®) gemessen oder entsprechend 1,75/1,82/1,52 %, 1,63/1,29/1,4 % und 1,66/1,53/1,54 %.

Tag 21 zeigte sich bei unbeschichteten Platten im Durchschnitt 77.847 Zellen/cm², im Median 84.065, IQR 29.335 Zellen/cm², bei Platten, die mit Gelatine beschichtet worden waren im Durchschnitt 80.172 Zellen/cm², im Median 85.431 Zellen/cm², IQR 18.857 Zellen/cm² und bei Platten mit einer Beschichtung mit MatriGel® im Durchschnitt 82.385 Zellen/cm², im Median 89.230 Zellen/cm², IQR 28.204 Zellen/cm². Für die CellTox Green™-positiven Zellen ergaben sich pro Quadratzentimeter Zellmengen von 703,1/341,4/1.046,7, 757,9/437,5/1.147,2 und 571,9/416,3/409,5 was einem Anteil von 0,91/0,44/1,01 %, 0,94/0,5/1,37 % bzw. 0,69/0,48/0,54 % entspricht (Abb. 7, Abb. 11, Abb. 12, Tab. 3).

Im Shapiro-Wilk-Test waren die meisten Daten nicht parametrisch verteilt, weshalb der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich zwischen den verschiedenen Beschichtungen durchgeführt wurde. An Tag 1 zeigte sich ein statistisch relevanter Unterschied von $p < 0,05$. Mittels Post-hoc-Analyse durch den Mann-Whitney-U-Test zeigte sich der Unterschied von $p = 0,0073$ an diesem Tag zwischen der Gruppe der unbeschichteten und der mit Gelatine-beschichteten Platten. An den anderen Tagen zeigten sich keine statistisch relevanten Abweichungen hinsichtlich der Zellmengen der lebenden Zellen bei verschiedenen Beschichtungsarten am gleichen Messtag.

Ebenso war die Anzahl der toten Zellen auf den verschiedenen beschichteten Proben ähnlich; hier zeigten sich ebenfalls keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. 9, Abb. 10).

Die Zellmenge vermehrte sich in der ersten Woche, d.h. zwischen Tag 1 und 7 durchschnittlich bzw. im Median um 110,72 % bzw. 126,56 % bei den unbeschichteten Wells, um 77,32 % bzw. 75,75 % bei den Gelatine-beschichteten Wells und um 74,94 % bzw. 87,45 % bei den mit MatriGel® beschichteten Wells. In der zweiten Woche betrug die Vermehrung durchschnittlich bzw. im Median 41,54 % bzw. 39,07 % für unbeschichtete, 60,56 % bzw. 57,28 % für Gelatine-beschichtete und 57,58 % bzw. 44,03 % für MatriGel®-beschichtete Wells. In der dritten Woche war die Vermehrung im Mittel/Median 40,12/50,33 %, 30,37/42,2 % und 38,53/59,89 % (Abb. 13, Abb. 14).

Die Vermehrungsrate wurde entsprechen folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert Zellemenge aktueller Tag} - \text{Mittelwert Zellemenge Woche zuvor}}{\text{Mittelwert Zellemenge Woche zuvor}}$$

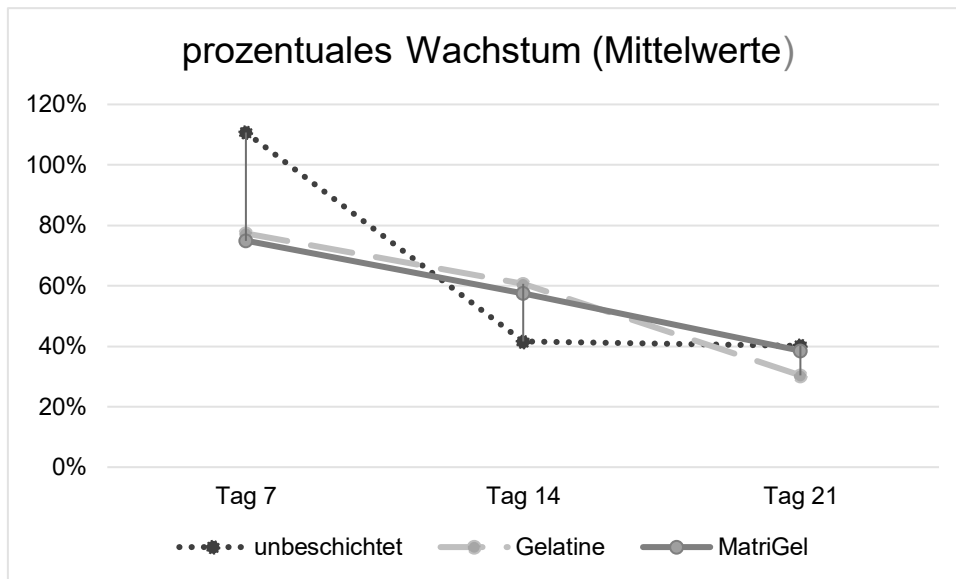


ABB. 13: WACHSTUM (PROZENTUAL) IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN MESSZEITPUNKT UNTERTEILT NACH BESCHICHTUNGSARTEN, BERECHNET AUS MITTELWERTEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF VERLANGSAMTE SICH DAS WACHSTUM.

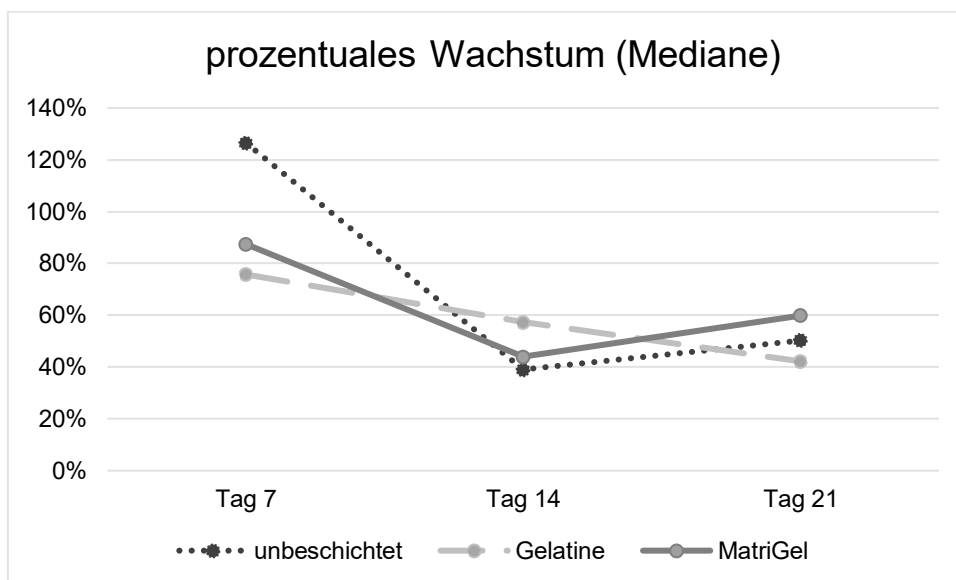


ABB. 14: WACHSTUM (PROZENTUAL) IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN MESSZEITPUNKT UNTERTEILT NACH BESCHICHTUNGSARTEN, BERECHNET AUS MEDIANEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF VERLANGSAMTE SICH DAS WACHSTUM.

3.4 ZELLWACHSTUM PCL-GEWEBESTÜCKE

Die nativen PCL-Gewebestücken wurden von beiden Seiten im Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Zum Teil waren sie nur von einer Seite besiedelt, was vermutlich daran liegt, dass sich einzelne Gewebestücke während des Mediumwechsels unbemerkt gewendet haben. Dies fiel erst in der mikroskopischen Betrachtung auf.

3.4.1 BETRACHTUNG DER OBERFLÄCHEN AM REM

Die Oberseite des Gewebes (an Tag 1 besiedelt) wirkte bei Betrachtung im REM ebenmäßiger und die oberste Faserschicht schien in einer Ebene zu liegen. Dem hingegen erschien das PCL-Gewebe auf der Unterseite ungleichmäßiger und einzelne Fasern waren ungespannt, gekringelt und lagen scheinbar auf der darunter liegenden, flacheren Schicht auf (Abb. 2, Kapitel 2.1).

Da sich bei den PCL-Platten kein statistisch relevanter Unterschied der Zellmengen zwischen verschiedenen beschichteten und unbeschichteten Platten zeigte, wurden die Versuche mit den PCL-Gewebestücke an unbeschichteten Proben durchgeführt. Für eine Übersicht und das Wachstumsverhalten der Zellen wurden die Aufnahmen am REM genutzt. Des Weiteren wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht, auf welche nachfolgend eingegangen wird. Die Gewebestücke waren ab Tag 1 beidseitig besiedelt. An Tag 7 waren zwischen den einzelnen Zellen noch Lücken zu sehen. An Tag 14 zeigten sich auf beiden Seiten bereits große Zellhaufen aus reichlich Zellen. Allerdings waren die Zellen mit ihren Ausläufern mehr radial ausgerichtet im Gegensatz zu den Aufnahmen des PCL-Materials der Platten, wo meist alle Zellen in einer Längsrichtung orientiert waren. An Tag 21 war auf der Oberseite eine nahezu ununterbrochene Zelldecke zu sehen war. Auf der Unterseite waren die Zellen kleiner, hatten weniger Ausläufer und es waren weiterhin unbewachsene Bereiche zwischen den Zellen zu sehen (Abb. 15, Abb. 16).

Das Zellwachstum auf den Platten und der Oberseite der PCL-Gewebestücke erschien schneller als das Zellwachstum auf der Unterseite der Gewebestücke. Bereits an Tag 7 zeigte sich dieser Unterschied: Die Ergebnisse auf der Oberseite waren mit den Ergebnissen der Platten vergleichbar. Die Unterseite war weniger bewachsen. Die Gewebestücke waren allerdings dicker als das PCL-Material an den Plattenböden. Daher wurde ebenfalls untersucht, ob die Zellen auch in das Gewebe einwachsen.

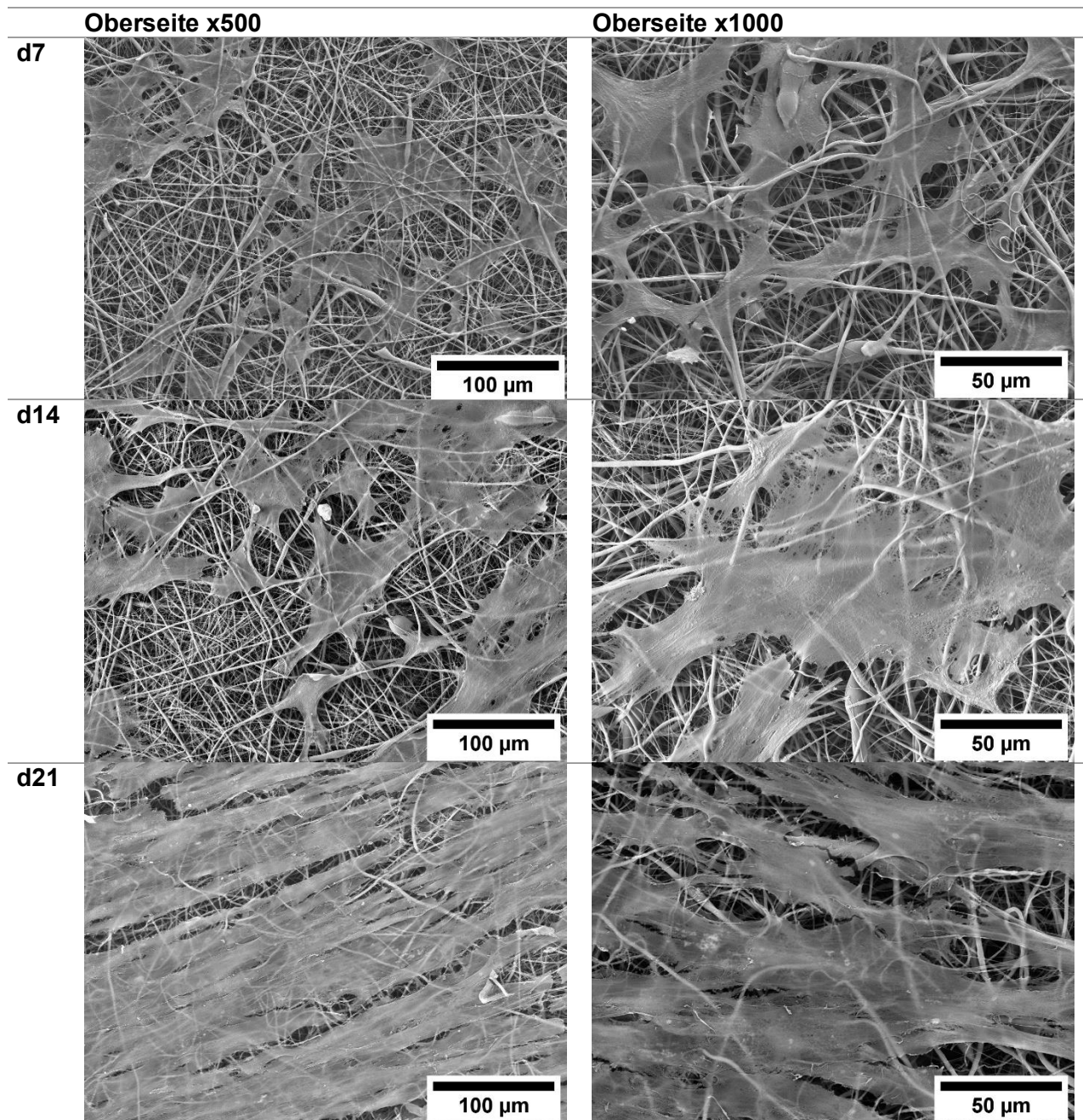


ABB. 15: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER OBERSEITE DER BESIEDELTEN GEWEBESTÜCKE AN TAG 7, 14 UND 21 IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF IMMER DICHTER WERDENDE ZELLDECKE ERKENNBAR.

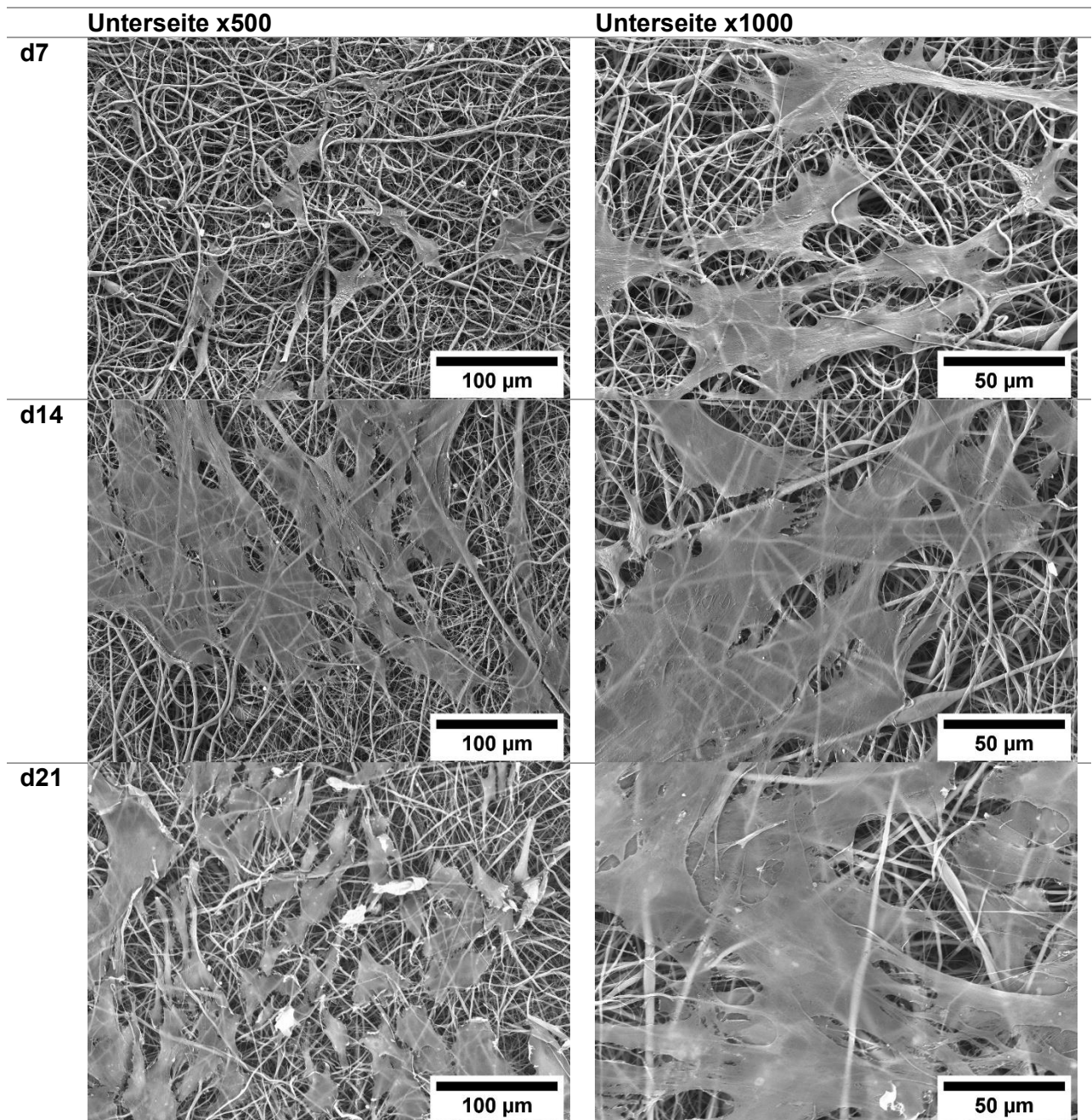


ABB. 16: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER UNTERSEITE DER BESIEDELTEN GEWEBESTÜCKE AN TAG 7, 14 UND 21 IN ZWEI VERSCHIEDENEN VERGRÖßERUNGEN. IM ZEITLICHEN VERLAUF IMMER DICHTER WERDENDE ZELLDECKE ERKENNBAR.

3.4.2 DREIDIMENSIONALE BETRACHTUNG AM FLUORESZENZMIKROSKOP

Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop dienten vornehmlich dazu, die Proben auch in verschiedenen Ebenen zu betrachten. Am Axio Observer wurden die Zellen anhand der angefärbten Zellkerne (Hoechst) betrachtet, da die Zellkörperfärbung mittels CellTracker-Red weniger gut einzustellen war. Es konnten neben einfachen Bildern über die Funktion „Z-Stack“ vollautomatisch Bilder eines Bereichs in verschiedenen Fokushöhen in einem zuvor gewählten

Abstand aufgenommen werden. In diesen Z-Stack-Aufnahmen zeigte sich, dass sich die Zellkerne in verschiedenen Ebenen befanden.

An Tag 7 waren vereinzelt Zellkerne zu sehen. Hier war bereits erkennbar, dass nicht alle Zellen in der gleichen Ebene scharf einzustellen waren (Abb. 17). An Tag 14 waren Ansammlungen von Zellkernen erkennbar. Dazwischen befanden sich jedoch noch Lücken. Bei einem großen Zellhaufen konnten Zellen 11 μm entfernt voneinander dargestellt werden (Abb. 18). An Tag 21 waren die Zellkerne gleichmäßiger über das Material verteilt. Hier zeigte sich ebenfalls, dass Zellen eines Zellhaufens in unterschiedlichen Fokushöhen lagen (Abb. 19).

Es stellte sich heraus, dass auch die Fasern des PCL-Materials mit Hoechst angefärbt werden. Daher sind diese auf den folgenden Bildern zu sehen, obgleich es sich um Aufnahmen aus dem Fluoreszenzmikroskop handelt.

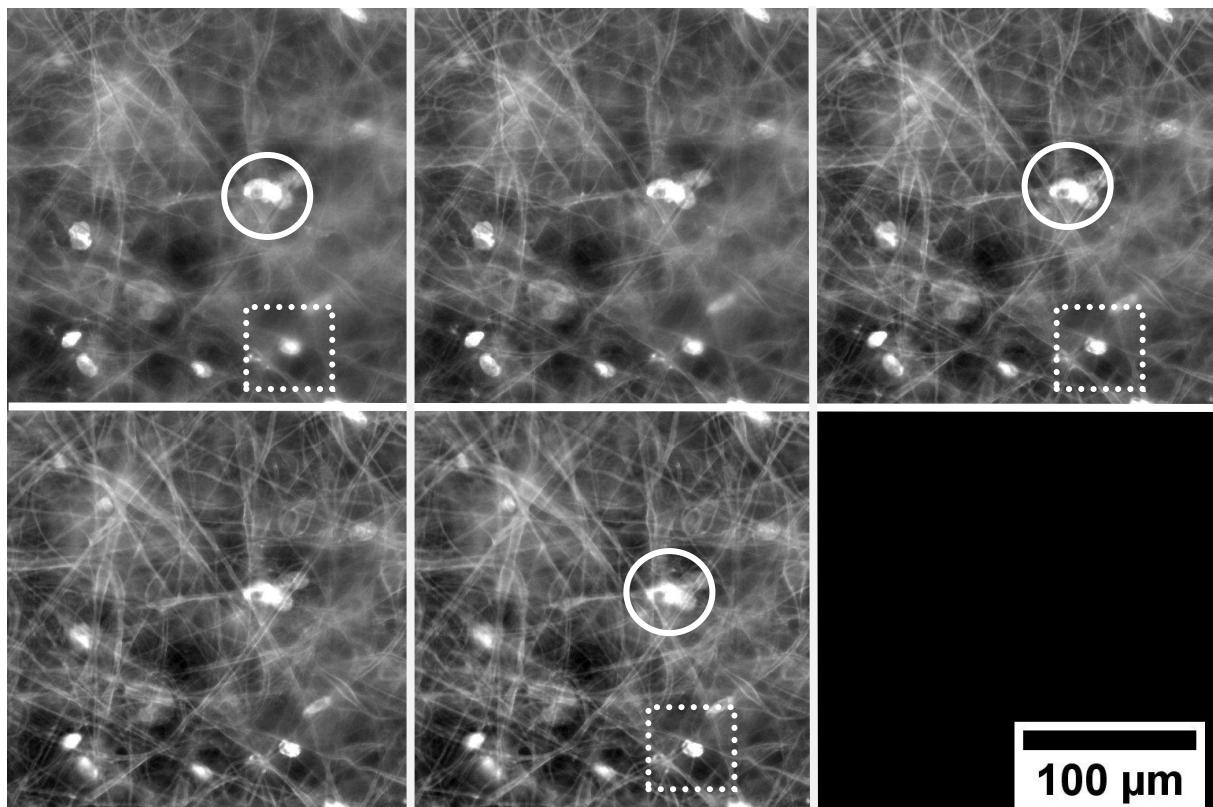


ABB. 17: FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE SCHICHTBILDER EINES GEWEBESTÜCKES AN TAG 7. ZEILENWEISE VON LINKS NACH RECHTS WURDE JE 1 μm TIEFER EIN BILD AUFGENOMMEN, ES LASSEN SICH ZELLEN IN VERSCHIEDENEN EBENEN ERKENNEN, EXEMPLARISCH ZEIGEN GLEICHARTIGE MARKIERUNGEN JEWEILS DIE GLEICHE ZELLE, DIE IN UNTERSCHIEDLICHEN EBENEN SCHARF ZU SEHEN IST.

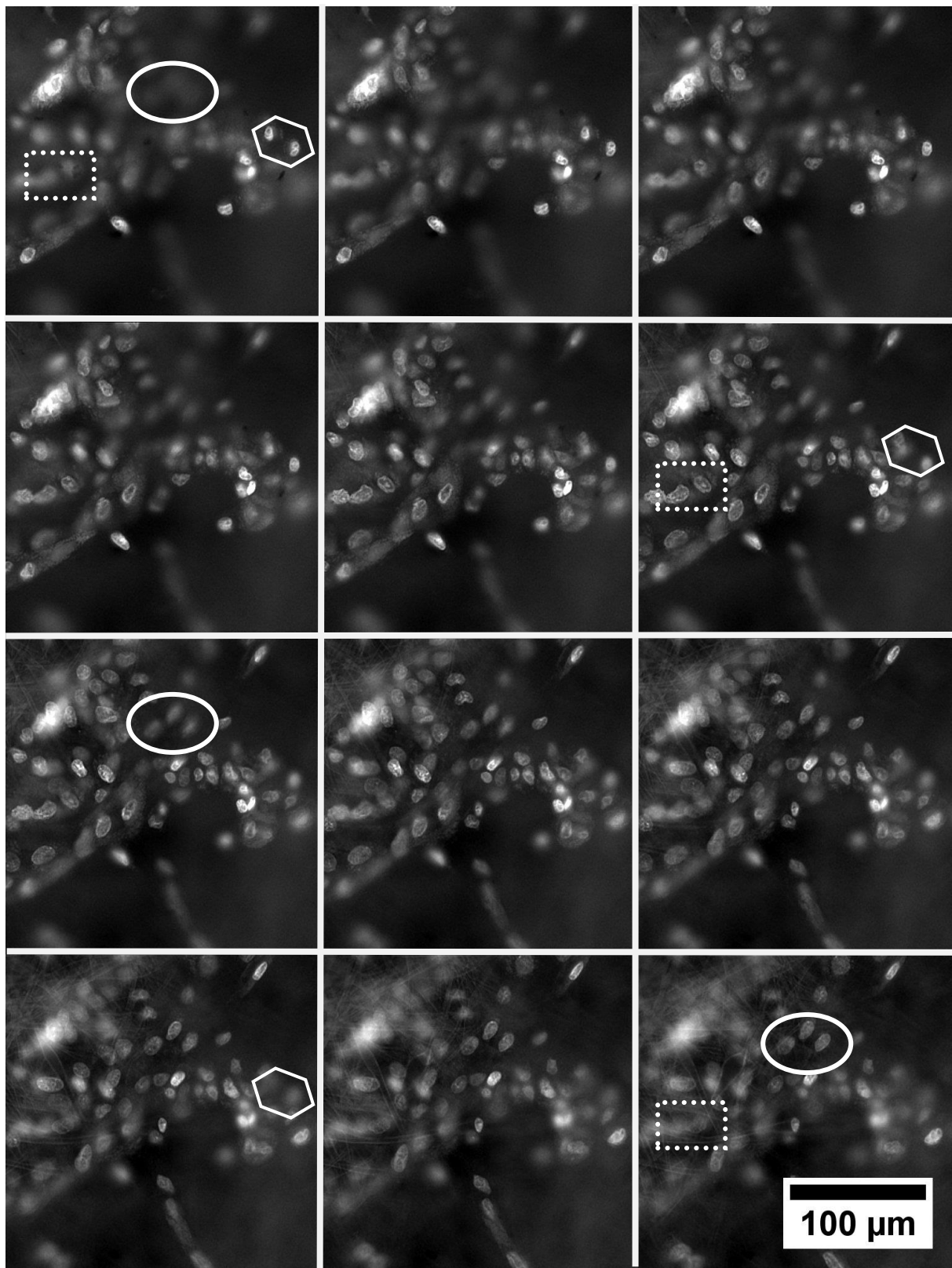


ABB. 18: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE SCHICHTBILDER EINES GEWEBESTÜCKES AN TAG 14. ZEILENWEISE VON LINKS NACH RECHTS WURDE JE 1 μm TIEFER EIN BILD AUFGENOMMEN, ES LASSEN SICH ZELLEN IN VERSCHIEDENEN EBENEN ERKENNEN, EXEMPLARISCH ZEIGEN GLEICHARTIGE MARKIERUNGEN JEWEILS DIE GLEICHE ZELLE, DIE IN UNTERSCHIEDLICHEN EBENEN SCHARF ZU SEHEN IST.

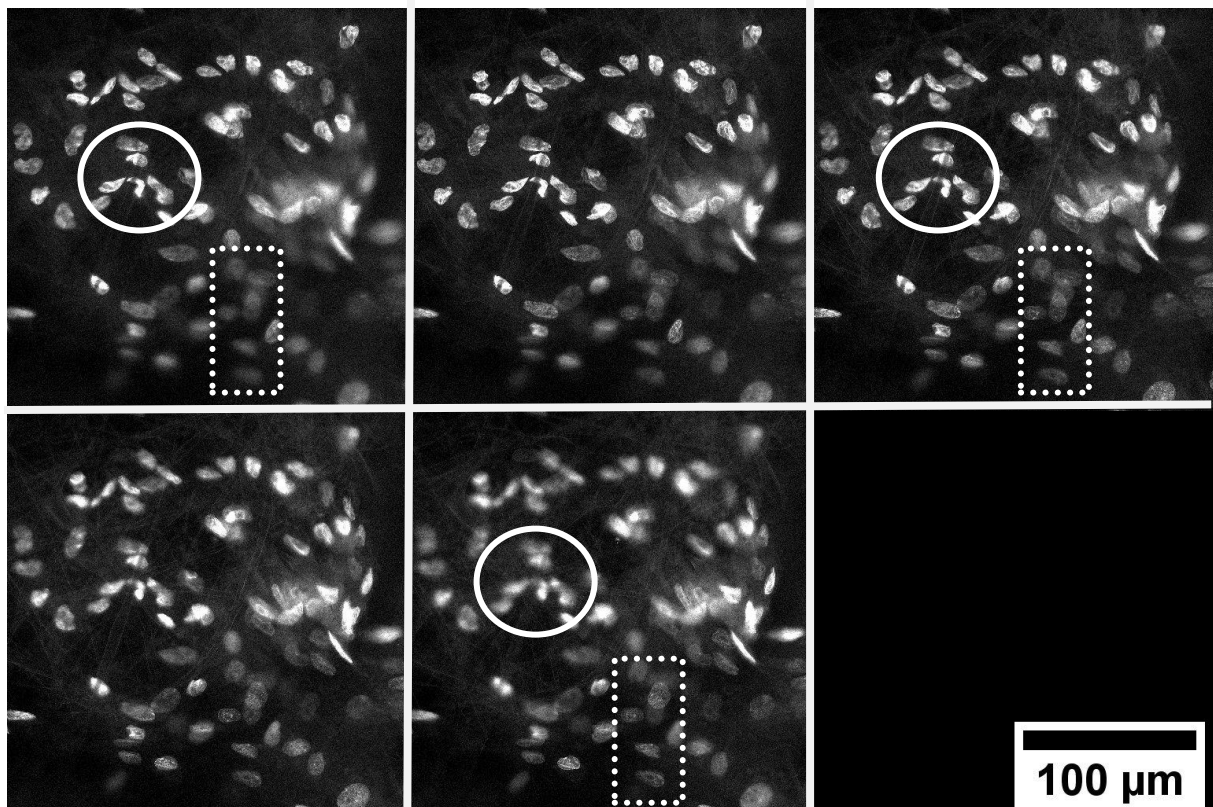


ABB. 19: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE SCHICHTBILDER EINES GEWEBESTÜCKES AN TAG 21. ZEILENWEISE VON LINKS NACH RECHTS WURDE JE 1 μm TIEFER EIN BILD AUFGENOMMEN, ES LASSEN SICH ZELLEN IN VERSCHIEDENEN EBENEN ERKENNEN, EXEMPLARISCH ZEIGEN GLEICHARTIGE MARKIERUNGEN JEWEILS DIE GLEICHE ZELLE, DIE IN UNTERSCHIEDLICHEN EBENEN SCHARF ZU SEHEN IST.

3.5 MECHANISCHE TESTUNG DER PCL-GEWEBESTÜCKE UND VERGLEICH ZU PORCINEN PULMONALKLAPPENSEGELN

Um zu überprüfen, ob die Besiedelung mit pMSCs die mechanische Widerstandsfähigkeit des PCL-Gewebes veränderte, wurden statische und zyklische Zugtestungen an unbesiedeltem und besiedeltem Gewebe durchgeführt. Diese Daten wurden miteinander und mit Werten von nativen porcinen Pulmonalklappen verglichen.

3.5.1 BRUCHPUNKTTTESTUNGEN

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden die verschiedenen Gruppen mittels des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Die Werte sind nach folgendem Schema angegeben: Mittelwert/Median/IQR. Die Bruchpunkt-Testungen der PCL-Gewebestücke ergaben im Mittelwert ein Elastizitätsmodul von 2,13 MPa, im Median 1,81 MPa mit einem IQR von 1,53 MPa für besiedeltes ($n = 21$) und im Durchschnitt 2,12 MPa, im Median 2,33 MPa und ein IQR von 1,15 für unbesiedeltes PCL ($n = 6$). Daten von nativen porcinen Pulmonalklappensegeln aus Messungen unserer Arbeitsgruppe zeigten Werte von 4,83/3,73/2,43 MPa bei radialem ($n = 14$) und 66,26/64,95/48,33 MPa bei zirkumferentiell (Zug) ($n = 7$) (84). Die

Elastizitätswerte für radialen Zug an Pulmonalklappen und die Werte der PCL-Proben waren im Mann-Whitney-U-Test mit $p = 0,0002$ verschieden. Für besiedeltes PCL-Gewebe gegenüber zirkumferentiell Zug ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied von $p < 0,0001$. Besiedeltes und unbesiedeltes PCL waren in ihrer Elastizität vergleichbar (Tab. 4, Abb. 20).

TAB. 4: ELASTIZITÄTSMODUL, MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT UND DEHNUNGSLÄNGE BEI MAXIMALER ZUGKRAFT FÜR BESIEDELTE UND UNBESIEDELTE PCL-GEWEBESTÜCKE SOWIE RADIAL UND ZIRKUMFERENTIELL GETESTETE PORCINE PULMONALKLAPPENSEGEL AUS DATEN DER EINFACHEN ZUGTESTUNG, F_{max} = MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT/-KRAFT, n = MENGE, WERTE ANGEGBEN NACH FOLGENDEM SCHEMA MITTELWERT/MEDIAN/INTERQUARTILSABSTAND (IQR)

	Elastizitätsmodul E (MPa)	Maximale Zugfestigkeit F_{max} (N)	Dehnungslänge bei F_{max} (%)
<i>besiedelt</i> ($n = 21$)	2,13/1,81/1,53	0,67/0,52/0,18	126,9/121,3/47,2
<i>unbesiedelt</i> ($n = 6$)	2,12/2,33/1,15	0,51/0,54/0,14	111,5/110,2/10,7
<i>Pulmonalklappe porcin radial</i>	4,84/3,73/2,43	1,19/1,08/0,37	104,7/94,36/47,2
<i>Pulmonalklappe porcin zirkumferentiell</i>	66,26/64,95/48,33	9,69/10,67/3,29	48,38/44,99/17,51

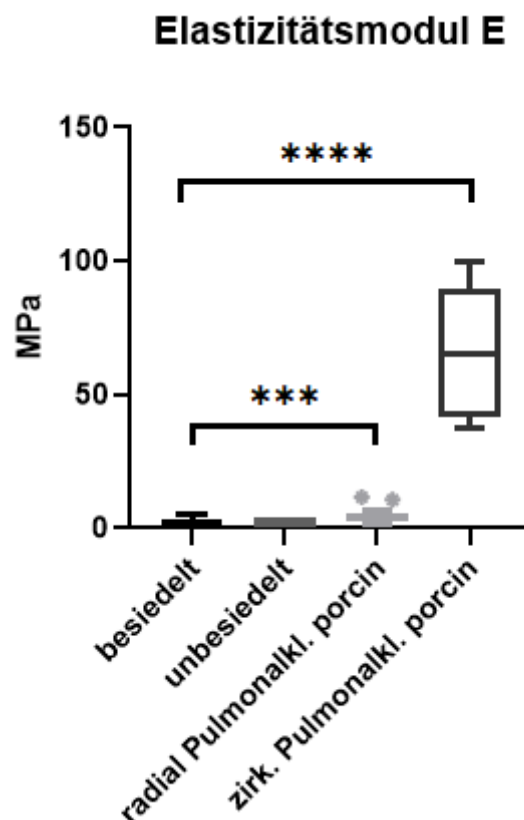


ABB. 20: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER ELASTIZITÄTSMODULE DER VERSCHIEDENEN PROBEN BEI EINFACHEN ZUGTESTUNGEN. DAS ELASTIZITÄTSMODUL DER PORCINEN PULMONALKLAPPEN IN ZIRKUMFERENTIELLER TESTUNG IST WESENTLICH HÖHER. STATISTISCH RELEVANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN PCL-GEWEBE UND PORCINEN PULMONALKLAPPEN, *, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$, E = ELASTIZITÄTSMODUL, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.**

Die maximale Zugfestigkeit ($F_{\max}$) der Proben betrug 0,67/0,52/0,18 N (Mittelwert/Median/IQR) bei besiedeltem und 0,51/0,54/0,14 N bei unbesiedeltem PCL-Gewebe. Die Daten der porcinen Pulmonalklappensegel waren 1,19/1,08/0,37 N bei radialem Zug und 9,69/10,67/3,29 N bei zirkumferentielltem Zug (84). Hieraus ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied von $p < 0,0001$ zwischen besiedeltem PCL und Pulmonalklappen im radialen Zug und ebenfalls zwischen besiedeltem PCL und zirkumferentielltem Zug. Besiedeltes und unbesiedeltes PCL waren auch bezüglich der maximalen Zugfestigkeit vergleichbar (Tab. 4, Abb. 21).

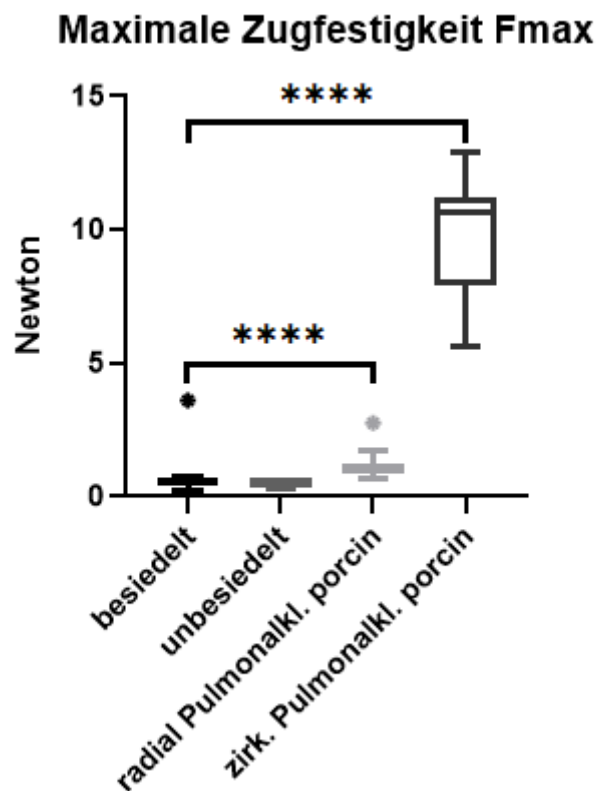


ABB. 21: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER MAXIMALEN ZUGFESTIGKEIT IN NEWTON DER VERSCHIEDENEN PROBEN BEI EINFACHEN ZUGTESTUNGEN. DIE MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT DER PORCINEN PULMONALKLAPPEN IN ZIRKUMFERENTIELLER TESTUNG IST WESENTLICH HÖHER. STATISTISCH RELEVANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN PCL-GEWEBE UND PORCINEN PULMONALKLAPPEN, ****: $p < 0,0001$, $F_{\max}$ = MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

Des Weiteren wurde die Länge errechnet, um welche sich der eingespannte Bereich der Proben bei maximaler Zugkraft ($F_{\max}$) prozentual gedehnt hatte, ausgehend von der Anfangslänge von 5 mm. Für die PCL-Gewebe ergaben sich hier Werte von 126,9/121,3/47,2 % für besiedelte und 111,5/110,2/10,7 % für unbesiedelte Proben. Die nativen Pulmonalklappensegel dehnten sich in radiale Richtung um 104,7/94,36/47,2 % und 48,38/44,99/17,51 % in zirkumferentielle Richtung (84). Hieraus ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied von $p = 0,0196$ zwischen besiedeltem PCL-Gewebe und den Pulmonalklappen in radialem Zug

sowie ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,0001$ zwischen besiedeltem PCL-Gewebe und porcinen Pulmonalklappen in zirkumferentieller Zugrichtung. Die Dehnungslängen zwischen besiedeltem und unbesiedeltem PCL-Gewebe waren nicht signifikant voneinander abweichend (Tab. 4, Abb. 22).

Dehnung bei maximaler Zugkraft (%)

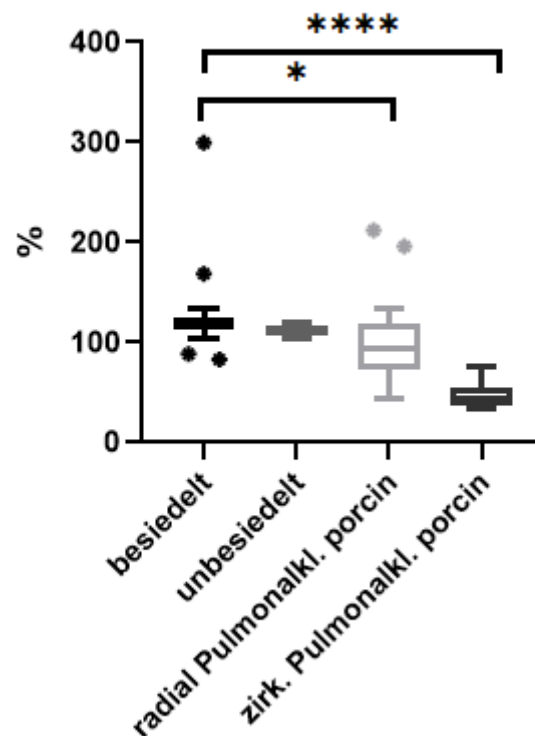


ABB. 22: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER PROZENTUALEN DEHNUNG BEI MAXIMALER ZUGKRAFT DER VERSCHIEDENEN PROBEN BEI EINFACHEN ZUGTESTUNGEN. WESENTLICHE UNTERSCHIEDE DER DEHNUNGSLÄNGE ZWISCHEN PORCINEN PULMONALKLAPPEN IN ZIRKUMFERENTIELLER RICHTUNG UND PCL-GEWEBE. STATISTISCH RELEVANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN PCL-GEWEBE UND PORCINEN PULMONALKLAPPEN; *: $p < 0,05$, ****: $p < 0,0001$, PCL = POLY- ϵ -CAPROLACTONE.

3.5.2 ZYKLISCHE ZUGTESTUNG

Bei den durchgeführten zyklischen Zugtestungen wurde die maximale Zugkraft auf Grundlage der Bruchpunkttestungen auf 0,45 N begrenzt, was sich mit der gemessenen $F_{\max}$ von 0,44/0,44/0,002 N (Mittelwert/Median/IQR) für besiedeltes ($n = 21$) und unbesiedeltes Gewebe ($n = 8$) bestätigte. Die Messungen unserer Arbeitsgruppe an nativen porcinen Pulmonalklappensegeln wurden mit einer maximalen Zugkraft von 6,6/6,3/0,02 N ($n = 9$) durchgeführt (Tab. 5).

Die prozentuale Dehnungslänge ausgehend von den anfänglichen 5 mm bei dieser Art der Zugtestung betrug bei besiedeltem PCL-Gewebe 92,86/89/21 %, bei unbesiedeltem PCL-Gewebe 68,38/68,5/21,5 % und bei porcinen Pulmonalklappensegeln 27,96/25,25/17,55 %. Dies entsprach einem statistisch signifikanten Unterschied von $p = 0,0022$ zwischen besiedeltem und unbesiedeltem PCL und $p < 0,0001$ zwischen besiedeltem PCL-Gewebe und nativen Pulmonalklappensegeln (Tab. 5, Abb. 23).

In den unten gezeigten Hysteresekurven kann man erkennen, dass die Proben zu Beginn, bei niedrigen Kräften wieder in ihren Ursprungszustand zurückkehrten und sich somit auf die Ausgangslänge verkürzten. Bei anhaltender Belastung, ca. ab dem 5. Zyklus (2,5 N), erreichten sie ihre ursprüngliche Form allerdings nicht mehr. Dabei war die Dehnungslänge in der Entlastungsphase bei gleicher Kraft höher als in der Belastungsphase. Es fiel weiterhin auf, dass die Kurve nicht linear war, sondern kurz vor Erreichen der maximalen Zugkraft des Zyklus eine geringere Steigung aufwies. (Abb. 24, Abb. 25).

TAB. 5: MAXIMALE ZUGKRAFT UND DEHNUNGSLÄNGE BEI MAXIMALER ZUGKRAFT FÜR BESIEDELTE UND UNBESIEDELTE PCL-GEWEBESTÜCKE AUS DATEN DER ZYKLISCHEN ZUGTESTUNG, $F_{\max}$ = MAXIMALE ZUGKRAFT, n = MENGE, WERTE ANGEZEIGT NACH FOLGENDEM SCHEMA MITTELWERT/MEDIAN/INTERQUARTILSABSTAND (IQR)

	<i>Maximale Zugkraft $F_{\max}$ (N)</i>	<i>Dehnungslänge bei $F_{\max}$ (%)</i>
<i>besiedelt ($n = 21$)</i>	0,44/0,44/0,002	92,86/89/21
<i>unbesiedelt ($n = 8$)</i>	0,44/0,44/0,002	68,38/68,5/21,5
<i>Pulmonalklappe porcin ($n = 9$)</i>	6,6/6,3/0,02	27,96/25,25/17,55

Dehnung bei maximaler Zugkraft (%)

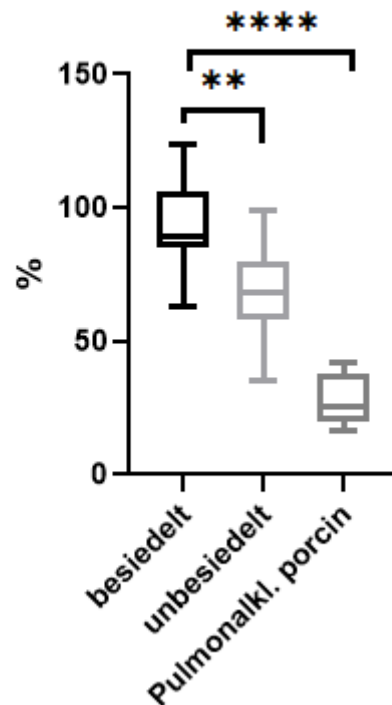


ABB. 23: BOX-PLOT-WHISKER-DIAGRAMM DER PROZENTUALEN DEHNUNG BEI MAXIMALER ZUGKRAFT DER VERSCHIEDENEN PROBEN BEI ZYKLISCHEN ZUGTESTUNGEN. WESENTLICHE UNTERSCHIEDE DER DEHNUNGSLÄNGEN, STATISTISCH RELEVANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN BESIEDELTEM PCL-GEWEBE UND UNBESIEDELTEM GEWEBE SOWIE ZWISCHEN BESIEDELTEM GEWEBE UND PORCINEN PULMONALKLAPPEN; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, PCL = POLY-E-CAPROLACTONE.

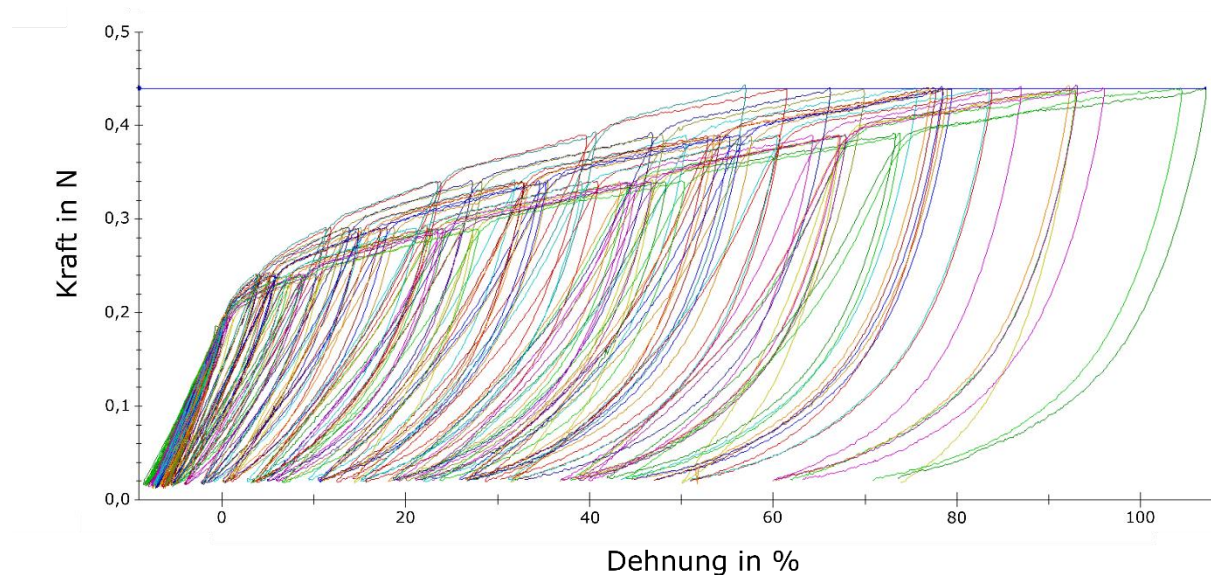


ABB. 24: HYSTERESEKURVEN ALLER PCL-GEWEBESTÜCKE BEI DYNAMISCHEN ZUGTESTUNGEN IN NEUN ZYKLEN MIT ANSTIEGENDER KRAFT IN 0,05 N-SCHRITTEN VON 0,05 AUF 0,45 N. UNGEFÄHR AB ZYKLUS 5 WIRD DIE URSPRÜNGLICHE LÄNGE (0 % DEHNUNG) AUCH BEI VOLLSTÄNDIGER ENTLASTUNG NICHT MEHR ERREICHT.

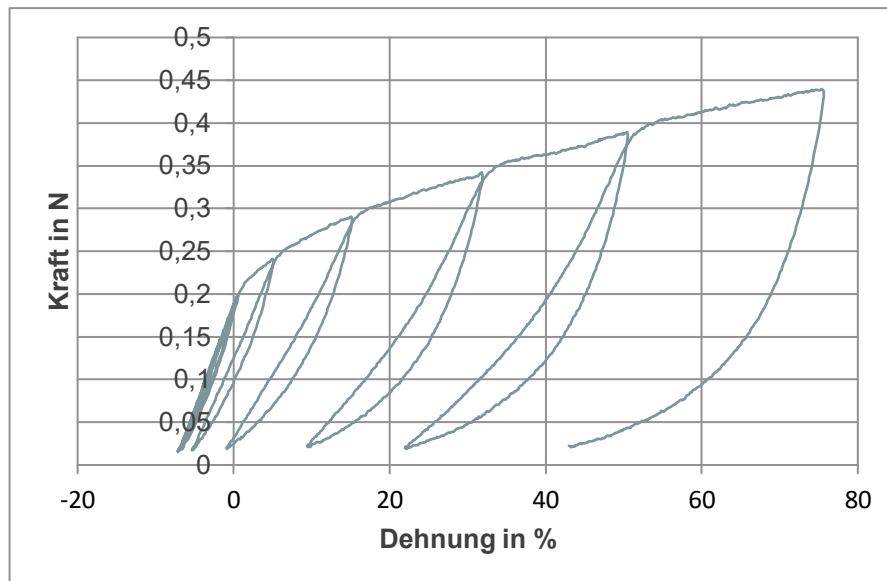


ABB. 25: HYSTERESEKURVE EINER REPRÄSENTATIVEN PROBE BEI DYNAMISCHEN ZUGTESTUNGEN IN NEUN ZYKLEN MIT ANSTEIGENDER KRAFT IN 0,05 N-SCHRITTEN VON 0,05 AUF 0,45 N. IM VERLAUF WIRD AB ZYKLUS 5 DIE URSPRÜNGLICHE LÄNGE (0 % DEHNUNG) AUCH BEI VOLLSTÄNDIGER ENTLASTUNG NICHT MEHR ERREICHT.

4 DISKUSSION

Die heute verfügbaren Möglichkeiten des Herzklappenersatzes haben den Nachteil, dass sie schnell degenerieren oder eine lebenslange Antikoagulation benötigen (20–22,24,30). Gerade bei kongenitalen Herzerkrankungen ist ein weiterer Nachteil, dass Herzklappenprothesen nicht mitwachsen und so bei Kindern nicht nur aufgrund der Degeneration ausgetauscht werden müssen, sondern auch, da sie sich nicht dem wachsenden Herzen anpassen können (3,4,31,33). Tissue-engineerte Herzklappen haben das Potential, die oben genannten Risiken zu bewältigen, da sie aus vitalem Gewebe bestehen, sich umbauen und mitwachsen können (3,4,44).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der Besiedelung von bioresorbierbarem Kunststoff in Form von Poly- ϵ -caprolactone (PCL) durch porcine mesenchymale Stammzellen (pMSCs) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen auf PCL vermehren und vital sind. Hintergrund dieser Arbeit ist die Forschung nach geeigneten Zellen und Grundgerüsten zur Herstellung von autologen Herzklappen im Rahmen von Tissue Engineering. Diese müssen den physiologischen Drücken und Scherkräfte des Herzkreislauf-Systems standhalten. Durch in-vitro Testungen sollten die biologischen und mechanischen Eigenschaften der so hergestellten Gewebe für spätere Fabrikation von autologen Herzklappen evaluiert werden.

4.1 VERHALTEN DER PMSCS

4.1.1 WACHSTUMSVERHALTEN AUF PCL-MATERIAL

Die Böden der PCL NanoECM-Platten waren an Tag 21 im REM optisch voll besiedelt, dies entspricht einer durchschnittlichen Zellmenge von 77.847 bis 82.385 Zellen/cm².

Es zeigte sich, dass die Zellen im Laufe der Experimente immer langsamer wuchsen. In der ersten Woche gab es noch eine wöchentliche Vermehrung von ca. 75–110 % (Mittelwert) bzw. 75–125 % (Median) mit Schwankungen zwischen den verschiedenen Beschichtungen. Zwischen Tag 14 und 21 war es nur noch eine Zellzahlerhöhung um ca. 30–40 % bzw. 40–60 %. Im Verlauf nahmen auch die Anteile der avitalen Zellen ab.

Laut einem Review von Cheung et al. (4) ist es wichtig, dass die gezüchteten Herzklappen schnell durch die Zellen bedeckt sind. Dies ließe sich mit MSCs bei entsprechender Zellmenge binnen 3 Wochen erreichen. Das im Verlauf verlangsamte Wachstum legt nahe, dass die Zellen mit der Zeit zu wenig Platz oder zu wenig Nährstoffe hatten. Eventuell hätte man die Vermehrungsgeschwindigkeit konstanter halten können, wenn der Mediumswechsel im Verlauf in

zeitlich kürzeren Abständen stattgefunden hätte. In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass Zellen in hohen Passagen dazu tendieren langsamer zu wachsen und weniger Extrazellulärmatrix-Komponenten zu produzieren (87,88). Die zur Besiedelung genutzten Zellen befanden sich in Passagen fünf, sechs und sieben. Es wäre also ebenfalls denkbar, dass Zellen einer niedrigeren Generation schneller zu einer vollständigen Besiedelung der Proben führen und/oder das Gewebe eine höhere mechanische Widerstandskraft vorwies. Auf der anderen Seite sollen tissue-engineerte Herzklappen schlussendlich mit autologen Zellen besiedelt werden, welche zuerst bei den Patienten entnommen und für die Besiedelung des Grundgerüsts expandiert werden müssen. Folglich ist es unrealistisch, eine sehr niedrige Passage verwenden zu können.

Obwohl das Gewebe mit den willkürlich ausgerichteten Fasern nicht anisotrop ist, so richteten sich die pMSCs dennoch nur entlang einer Richtung und parallel zueinander aus. Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass sich die Extrazellulärmatrix und hier im Besonderen die Kollagenfasern entsprechend der Zellen ausgerichtet haben (1). Demnach wäre zwar nicht das Grundgerüst, aber dennoch das gebildete Gewebe anisotrop. Dagegen präsentierten sich interstitielle Herzklappenzellen (valvular interstitial cells, VICs), welche auf willkürlich angeordneten PCL-Fasern kultiviert wurden, ohne einheitliche Form oder Orientierung. In der gleichen Arbeit waren VICs auf parallel angeordneten Fasern eher entsprechend der hier beobachteten Orientierung der MSCs zu erkennen (89).

Für die Zellmengen bei der Kultivierung der pMSCs auf PCL-Gewebe in dieser Arbeit gibt es keine quantitativen Daten. Allerdings ließen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen darauf schließen, dass zumindest die Oberseite der Gewebestücke in vergleichbarer Menge bewachsen war, wie die PCL-Platten, d.h. mit einer Zellmenge von ca. 80.000 Zellen/cm². Auf der Unterseite waren die PCL-Gewebestücke jedoch weniger bewachsen. Dies könnte daran liegen, dass unten die Diffusion der Nährstoffe nicht ausreichte, um den Zellen die gleichen Wachstumsbedingungen zu bieten, wie denjenigen auf der Oberseite. Denkbar wären auch Artefakte durch die Fixierung für das REM. Die Zellen könnten am Wellboden angewachsen gewesen und beim Herausnehmen des Gewebestückes von der Unterseite abgelöst worden sein. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Zellen in das, im Vergleich zu den Wellböden der PCL NanoECM-Platten, dickere Material des PCL-Gewebes begonnen hatten einzuwachsen und sich dadurch weniger Zellen auf der Oberfläche darstellen ließen. In der Fluoreszenzmikroskopie der PCL-Gewebestücke konnten einige Zellhaufen in verschiedenen Fokus-Höhen und damit auch in tieferen Gewebeschichten dargestellt werden, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen an Tag 21 bereits begonnen hatten in das PCL-Gewebe einzuwachsen. Dies liegt vermutlich an der dreidimensionalen Struktur der PCL-Fasern der Gewebestücke (84). Analog dazu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die

Zellen nicht nur auf der Oberfläche gewachsen waren, sondern sich bei adäquater Porengröße auch in den Fasern in der Mitte des Gewebes befanden (88,89).

Manche Proben waren auch nur von einer Seite besiedelt, was vermutlich daran lag, dass sich einzelne Gewebestücke während des Mediumwechsels unbemerkt gewendet hatten. Dies fiel erst in der mikroskopischen Betrachtung auf.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnten auch in dieser Arbeit keine toxischen Effekte auf das Zellwachstum festgestellt werden (89,90).

4.1.2 ZELLDIFFERENZIERUNG

Für das Herzklappengewebe sind laut Sacks et al. (3) vor allem vitale VICs wichtig, da diese für Umbau und Reparatur einer hochwertigen Extrazellulärmatrix verantwortlich sind und so auch das Wachstum der Herzklappe bedingen. In adulten Herzklappen liegen VICs vor allem als Fibroblasten vor (91). Daher wurde in der Arbeit von Duan et al. (91) untersucht, durch welche Zusätze sich MSCs aus Knochenmark oder Fettgewebe in dreidimensionalen hybriden Hydrogelen in die gewünschten Fibroblastenphänotypen differenzieren. Ihnen gelang, dass die Zellen durch Hinzufügen von PEGyliertem Fibroblastenwachstumsfaktor (basic fibroblastic growth factor, bFGF) und entsprechende Zellmedien Oberflächenmarker exprimierten, die zeigen, dass sie sich zu Fibroblasten differenzierten. Zudem war die EZM-Zusammensetzung vergleichbar mit der von VICs produzierten EZM. Das EZM-Remodeling war ebenfalls vergleichbar. Damit bewerteten sie MSCs als gute Option für tissue-engineerte Herzklappen, da Phänotyp und Funktion ähnlich der VICs seien. Allerdings soll bei der Gestaltung des Grundgerüsts darauf geachtet werden, dass es die MSCs dazu anregt, sich zu Fibroblasten und nicht zu ungünstigen Zellen, wie Osteoblasten oder Chondrozyten zu differenzieren (91). In Anbetracht dieser Ergebnisse, wäre in weiterführenden Experimenten eine längere Kultivierung von MSCs und eine anschließende Zellphänotypisierung interessant, um zu überprüfen, ob und wie die Zellen sich differenziert haben; beispielsweise könnte auch der Einfluss von dynamischen Kulturbedingungen beurteilt werden (4).

Tissue-engineerte Herzklappen sollen in erster Linie genutzt werden, um menschliche Herzklappenerkrankungen zu behandeln. Allerdings erfolgt die Forschung hierzu am Tiermodell, aus diesem Grund muss auch mit Zellen tierischen Ursprungs geforscht werden, wie hier mit porcinen MSCs. Es ist jedoch wichtig, sich verschiedene Eigenschaften zwischen Zellen verschiedener Spezies bewusst zu machen. Beispielsweise proliferierten ovine Zellen langsamer, benötigten geringere Mengen an Serum im Nährmedium und reagierten stärker auf mechanische Reize (88,92). Porcine MSCs wurden in dieser Arbeit in DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS kultiviert. Das Protokoll des Herstellers empfiehlt ergänzend die Zugabe von MSC-Wachstumszusatz und L-Glutamin (85). In verschiedenen Arbeiten wurden humane MSCs mit eben

diesen Zusätzen kultiviert, wohingegen für ovine Zellen teilweise Lammserum statt FCS verwendet wurde (53,88,93). Entsprechend Mol et al. (92) soll die Menge an Serum bei der Besiedelung und Kultivierung von Herzklappen mit ovinen Gefäßzellen reduziert werden, um Herzklappenstents zu erhalten, die vergleichbar sind mit Stents, die mit humanen MSCs besiedelt wurden. Der Mediumswechsel wurde bei humanen und ovinen Zellen analog zu dem Vorgehen in dieser Arbeit durchgeführt, d.h. zwei Mediumswechsel pro Woche (88,93). Somit ergibt sich für die Translation von Versuchen mit pMSCs auf die Forschung mit humanen MSCs keine Änderung bezüglich der Kulturbedingungen. Bei ovinen Zellen sollte hingegen die Menge und Art des Serums im Medium angepasst werden.

Sollten sich MSCs als optimale Zellen für die Herstellung gezüchteter Herzklappensegel herausstellen, könnten diese Zellen durch gering invasive Maßnahmen gewonnen werden. Dafür würden Fibroblasten aus der Haut oder mononukleäre Blutzellen mithilfe retroviralen Gentransfers oder episomaler Reprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen umgewandelt (94,95). Diese könnten anschließend wieder zu induzierten MSCs (iMSCs) differenziert werden und ständen für die Besiedelung bereit (84).

4.2 ROLLE DER BESCHICHTUNG

PCL wird im Rahmen des Tissue Engineerings häufig aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften wie der Festigkeit verwendet. Allerdings wird oft angeführt, dass es nicht das optimale Material für Zelladhäsion und Wachstum sei, da Poly- ϵ -caprolactone ein hydrophobes Material ist. Entsprechend einschlägiger Literatur böten hydrophile Stoffe bessere Voraussetzungen für Zelladhäsion und Vermehrung (19,90,96–98). Daher wurden in unterschiedlichen Studien Herzklappengrundgerüste aus einem Gemisch zweier verschiedener Materialien hergestellt. Neben PCL wurden unter anderem Poly-L-Milchsäure (PLLA) und Poly(ethylene glycol) verwendet, da diese zellfreundlichere Eigenschaften hätten (19,90). Angesichts dieser Erkenntnisse wurde das Zellwachstum auf nativem, unbeschichtetem PCL mit zwei verschiedenen Beschichtungsarten (MatriGel® und Gelatine) verglichen, um zu testen, ob Zellwachstum oder -adhäsion verbessert werden.

An Tag 1 und 21 waren die durchschnittlichen Zellzahlen der beschichteten Platten höher als die der unbeschichteten Platten. Dieser Trend war jedoch nicht an Tag 7 und 14 erkennbar und ließ sich auch nicht konstant einer Beschichtungsart zuordnen. So war die höchste durchschnittliche Zellzahl an Tag 1 bei den mit Gelatine beschichteten Platten zu finden und an Tag 21 bei den MatriGel® beschichteten Platten mit durchschnittlich 82.385 Zellen/cm². Überdies waren die Unterschiede nur an Tag 1 zwischen Gelatine-beschichteten und den unbeschichteten Platten signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass vor allem die Beschichtung mit Gelatine initial die Zelladhäsion und/oder -proliferation verbesserte (84). Laut des

Protokolls von Dr. Mariano Viapiano ist die Beschichtung jedoch auch nur nötig für Zellen mit geringer Affinität zu Plastik. MSCs hingegen wurden definiert als Plastik-adhärenente Zellen (62,86).

Eventuell würde eine Wachstumsanalyse über einen längeren Zeitraum einen eindeutigen Trend herausarbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich nicht ableiten, dass eine Beschichtung einen Mehrwert bezüglich des Zellwachstums bringe. Da sich für den hier untersuchten Zeitraum zwischen den Zellmengen von beschichteten und unbeschichteten PCL-Proben nur in einem Fall statistisch relevante Unterschiede zeigten, wurden die Versuche an den PCL-Gewebestücken ohne Beschichtung durchgeführt.

4.3 MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN

Herzklappen sorgen für einen unidirektionalen Blutfluss, indem sie bei der Herzaktion wie ein Ventil nur in eine Richtung öffnen. Hierbei müssen sie großer mechanischer Belastung standhalten (3,18). Daher sollte das ideale Material für künstliche Herzklappen besonders zugfeste und elastische Eigenschaften aufweisen (18,19,68,90).

Zuständig für die Elastizität und die Widerstandsfähigkeit von Herzklappen ist das Bindegewebe. Hierbei spielen insbesondere Kollagen, welches die Zugkräfte abfängt, sowie elastische Fasern, die dehnbar sind und dem Gewebe elastische Eigenschaften verleihen, eine wichtige Rolle. Zudem gibt es noch Proteo- sowie Glykosaminoglykane, welche Widerstand gegen Kompression ermöglichen (1,3,18,89,99).

Die Vergleiche zwischen unbesiedelten und besiedelten Gewebestücken in Bezug auf das Elastizitätsmodul, die maximale Zugfestigkeit und die Dehnungslänge in den Bruchpunkttestungen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Daher lässt sich feststellen, dass die Besiedelung und das Nährmedium nach drei Wochen die mechanischen Eigenschaften des Materials wenig bis nicht verändert hatten. Hierbei ist hervorzuheben, dass sich auch keine signifikante Verschlechterung der Werte zeigte. Jedoch ist hinzuzufügen, dass die Messwerte aus den Zugtestungen eine große Streuung aufwiesen.

Es lohnt sich die Frage zu erörtern, ob man nach einem längeren Beobachtungszeitraum einen signifikanten Unterschied wahrgenommen hätte. Beispielsweise konnten Brugmans et al. (58) nach sechs-wöchigen in-vitro Besiedelungsversuchen von PCL-Gewebe zeigen, dass die mit Gefäßzellen besiedelten Proben ein höheres E-Modul aufwiesen als die unbesiedelte Vergleichsgruppe. Dieser Trend lässt sich auch aus den vorliegenden Daten ablesen, allerdings sind die Unterschiede nicht statistisch relevant. Mutmaßlich wurde bis zum Messzeitpunkt noch nicht ausreichend EZM gebildet. Trotz allem ist anzunehmen, dass die Widerstandskraft mit einer längeren Kultivierung der Zellen und einer damit einhergehenden höheren EZM-Masse und -Qualität weiter steigen würde (100). Somit haben hergestellte Klappen aus PCL

und MSCs gute Aussichten mechanische Eigenschaften zu erreichen, die in-vivo benötigt werden.

Herzklappensegel werden aufgrund der eingangs erwähnten Anisotropie in radialer und zirkumferentieller Richtung getestet (18). Beim Vergleich zwischen den porcinen Pulmonalklappensegeln und den besiedelten PCL-Gewebestücken zeigten sich sowohl in radialer als auch zirkumferentieller Zugrichtung statistisch hoch relevante Unterschiede der maximalen Zugfestigkeit ($F_{\max}$) und der Elastizitätsmodule. Dies legt nahe, dass das besiedelte PCL-Gewebe, vermutlich durch eine noch unzureichende EZM, noch nicht die mechanischen Eigenschaften einer Pulmonalklappe erreicht hatte.

4.3.1 ELASTIZITÄTSMODUL

Die gemessenen Elastizitätsmodule der besiedelten PCL-Gewebestücke lagen mit 2,13 MPa (Mittelwert) bzw. 1,81 MPa (Median) weit unter den Werten für die gemessenen Pulmonalklappen, sogar für die elastischere, radiale Zugrichtung (4,84/3,73 MPa). Dies ist ein statistisch signifikanter Unterschied von $p = 0,0002$. Im Vergleich zu der zirkumferentiellen Testung (66,26/64,95 MPa) von Pulmonalklappen war der Unterschied mit $p < 0,0001$ noch deutlicher. Allerdings lagen die Elastizitätsmodule in den hier aufgeführten Testungen sehr hoch. Andere Quellen geben wesentlich geringere Werte des Elastizitätsmoduls an. Für radialen Zug von porcinen und humanen Aortenklappensegeln gibt es in der Literatur Angaben von 1,09 bis 2,89 MPa sowie für Testungen in zirkumferentieller Richtung 3,35 bis 28 ± 10 MPa (19,101,102).

Diese Differenzen könnten durch die Variabilität von biologischen Proben erklärt werden (18). Eventuell wurden auch unterschiedliche Dehnungsgeschwindigkeiten als die hier angewendeten 5 mm/min verwendet (103). Falls die in dieser Arbeit verwendeten Werte jedoch zu besonderes widerstandsfähigen Pulmonalklappen im hochnormalen Bereich gehören, würde die Unterschiede zwischen PCL-Gewebe und anderen Pulmonalklappensegeln geringer ausfallen und eher darauf hindeuten, dass die mechanischen Eigenschaften des PCLs mit porcinen Pulmonalklappen vergleichbar wäre. Korrekterweise sind die obigen Werte aus der Literatur Angaben für Aortenklappensegel. Allerdings zeigten Stradins et al. (104), dass die E-Module der beiden Klappen sehr ähnlich sind. Die Elastizitätsmodule der Pulmonalklappen waren sogar überwiegend geringer als die der Aortenklappe. Somit wären die Mittelwerte der gemessenen Elastizitätsmodule der PCL-Gewebestücke sowohl besiedelt (2,13 MPa) als auch nativ (2,12 MPa) innerhalb der üblichen Werte einer nativen Aortenklappe bei Zugtestungen in radialer Richtung. Ebenso verhalte es sich mit den Medianen (1,81 MPa und 2,33 MPa). Dies würde auch durch die Aussage unterstützt werden, das PCL ähnliche mechanische Eigenschaften habe, wie native human Herzklappen (19,90).

Hingegen sollten die Proben auch mit den Klappen in zirkumferentieller Zugrichtung vergleichbar sein, um die Funktion der Herzklappenprothese zu gewähren. Dies war bei den vorliegenden Daten nicht der Fall. Zweifellos können verschiedene Voraussetzungen, wie unterschiedliche Versuchsaufbauten und anderer Testgeräte zu divergierenden Ergebnissen führen, daher sind die oben genannten Vergleiche mit Vorsicht zu betrachten (84).

4.3.2 MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT UND DEHNUNGSLÄNGEN

4.3.2.1 BRUCHPUNKTTTESTUNGEN

Die Ergebnisse für die maximale Zugfestigkeit in den Bruchpunkttestungen deuten darauf hin, dass die PCL-Gewebestücke wesentlich weniger widerstandsfähig waren als die Pulmonalklappensegel in zirkumferentieller Zugrichtung. Bei den radialen Testungen stellte sich dieser Unterschied als wesentlich geringer, aber dennoch statistisch hoch signifikant dar.

Die in der Literatur angegebenen Werte für die maximale Zugfestigkeit als „ultimate tensile strength“ (UTS, maximale Zugfestigkeit) wurden in Pascal als Kraft pro Fläche angegeben. Um dies mit den in dieser Arbeit generierten Daten für die maximale Zugfestigkeit als $F_{\max}$ in Newton vergleichen zu können, wurden die Werte nachfolgend umgerechnet (Tab. 6). Die Fläche wurde berechnet als $5 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,5 \text{ mm}^2 = 0,0000005 \text{ m}^2$. Allerdings können die Daten verschiedener Arbeitsgruppen aufgrund anderer Messmethoden, Probengrößen und Einheit voneinander abweichen (18,84). Dies sollte bei den nachfolgenden Vergleichen beachtet werden.

TAB. 6: UMRECHNUNG DER WERTE FÜR DIE ZUGFESTIGKEIT VON NEWTON IN MEGAPASCAL; DIE ZUGRUNDE LIEGENDE FLÄCHE WURDE BERECHNET ALS $0,0000005 \text{ m}^2$, $F_{\max}$ = MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT, UTS = ULTIMATE TENSILE STRENGTH, MAXIMALE ZUGFESTIGKEIT

	$F_{\max} \text{ (N)}$	$UTS \text{ (MPa)}$
<i>besiedelt</i>	$0,67 \pm 0,68$	$1,34 \pm 1,36$
<i>unbesiedelt</i>	$0,51 \pm 0,12$	$1,02 \pm 0,24$
<i>Pulmonalklappe porcin radial</i>	$1,19 \pm 0,52$	$2,38 \pm 1,04$
<i>Pulmonalklappe porcin zirkumferentiell</i>	$9,69 \pm 2,49$	$19,38 \pm 4,98$

Balguid et al. (102) ermittelten für native humane Klappen Zugfestigkeitswerte von 0,4 MPa radial und 2,6 MPa zirkumferentiell. Daneben ergaben Testungen von ca. 4 Wochen statisch mit humanen Myofibroblasten besiedelter PGA-Geweben eine maximale Zugfestigkeit (UTS) von $0,73 \pm 0,16 \text{ MPa}$. Dadurch, dass hier verschiedenen Gewebe und Zellen verwendet wurden, sind diese Daten nicht direkt vergleichbar. Allerdings zeigte sich für beide Fälle, dass die UTS der tissue-engineerten Gewebe höher ist als bei den nativen Klappen in radialer Zugrichtung.

Ähnlich Werte wurden auch bei Testungen porciner Aortenklappensegel beschrieben. Die Spannweite ergibt sich aus Testungen mit verschiedenen Dehnungsgeschwindigkeiten: radial 0,34–0,84 MPa und zirkumferentiell 3,44–4,45 MPa (103). Im Vergleich zu den oben angegebenen Daten aus der Literatur liegt die maximale Zugfestigkeit der in dieser Arbeit gemessenen PCL-Gewebestücke in einem Bereich zwischen der radialen und zirkumferentiellen UTS nativer Klappen. Die mechanischen Eigenschaften der für diese Arbeit gemessenen porcinen Pulmonalklappen sind analog zu den Betrachtungen des Elastizitätsmoduls deutlich höher als die angegebenen Werte in der Literatur. Hierdurch könnte eventuell die hohe, statistisch relevante Abweichung erklärbar sein.

In-vivo beträgt der mittlere Druck im Lungenkreislauf ca. 15 mmHg und im Körperkreislauf 100 mmHg; dies entspricht ca. 2 bzw. 13,3 kPa. Die transvalvulären Drücke über Pulmonal- und Aortenklappe liegen bei 10 und 80 mmHg (1,3 und 10,7 kPa) (1,2,59,90). Allerdings unterliegt der Blutdruck im Körperkreislauf erheblichen physiologischen und pathologischen Schwankungen, wodurch auch wesentlich höhere Spitzendrücke von bspw. 200 mmHg oder ca. 26,6 kPa erreicht werden können. Die Werte der besiedelten PCL-Gewebestücke ergaben eine Maximalspannung von ca. 1.340 kPa. Dies entspricht rund 10.000 mmHg und liegt weit oberhalb der zu erwartenden Spitzendrücke im Herzkreislaufsystem. Daher ist anzunehmen, dass die besiedelten PCL-Gewebe den Spitzendrücken im Herzkreislaufsystem standhalten können. Jedoch sind dies Ergebnisse aus statischen Testungen über einen kurzen Zeitraum. Bei in-vivo Testungen würden auf die Proben mechanische Belastungen über einen langen Zeitraum und unter dynamischen Bedingungen einwirken. Daher lassen sich aus diesen Daten ohne dynamische Testungen keine genauen Vorhersagen für das Verhalten im Kreislaufsystem ableiten.

Es ergab sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Dehnungslängen von besiedelten PCL-Gewebestücken (126,9/121 %, Mittelwert/Median) und unbesiedeltem PCL-Gewebe (111,5/110 %). Vermutlich ist, wie bereits zuvor erwähnt, das von den MSCs synthetisierte Gewebe, u.a. Kollagen, noch nicht ausreichend, um die mechanischen Eigenschaften zu beeinflussen. Hasan et al. konnten für natives PCL-Gewebe eine durchschnittliche Dehnungslänge von ca. 65 % bei ähnlichem E-Modul von ca. 2,5 MPa feststellen (90). Diese hier angedeutete geringere Widerstandskraft könnte mit der Konfiguration des Materials (willkürlich angeordnet statt anisotrop) zusammenhängen oder durch andere Herstellungs- oder Messmethoden, wie bspw. unterschiedliche Faserdicken oder eine andere Dehnungsrate zustande gekommen sein.

Die getesteten Pulmonalsegel waren in radialer und zirkumferentieller Zugrichtung weniger dehnbar. Bei den zirkumferentiell getesteten Klappensegeln betrug die verwendete Zugkraft mehr als das Zehnfache der Kraft, welche für die PCL-Gewebestücke verwendet wurde. Hier

zeigte sich auch ein statistisch hoch relevanter Unterschied von $p < 0,0001$. Dagegen war die Kraft im radialen Zug im Durchschnitt nur doppelt so hoch und der Unterschied in der Dehnungslänge war nur gering signifikant ($p < 0,05$). Dessen ungeachtet kann auch bei Betrachtung dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass das vorliegende Gewebe noch widerstandsfähiger werden muss, um Herzklappen ersetzen zu können.

4.3.2.2 ZYKLISCHE ZUGTESTUNGEN

Mit Hilfe der zyklischen Zugtestungen sollten Erkenntnisse über die viskoelastischen Eigenschaften gewonnen werden und das PCL-Gewebe auch in dieser Kategorie mit nativen Klappen verglichen werden (18). Die porcinen Pulmonalklappensegel waren, wie bei den Bruchpunkttestungen trotz höherer aufgewendeter Zugkraft deutlich weniger nachgiebig. Bei dem Vergleich zwischen unbesiedeltem und besiedeltem PCL-Gewebe zeigte sich, dass die Dehnungslänge des unbesiedelten Gewebes statistisch relevant kleiner war als die des besiedelten PCL-Gewebes. Bereits in den Bruchpunkttestungen, ließ sich ein solcher Trend feststellen, obgleich der Unterschied dort nicht statistisch relevant war. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben: Einerseits könnte die maximale Zugfestigkeit des besiedelten Gewebes geringer sein als die des unbesiedelten Gewebes. Andererseits könnte es bedeuten, dass sich die besiedelten Proben weiter dehnen lassen, bevor sie zerreißen und damit elastischer sind. Es könnte jedoch auch der erheblich geringeren Stichprobengröße an unbesiedelten Proben ($n = 8$ vs. $n = 21$) und der großen Streuung der Messdaten der besiedelten Proben geschuldet sein.

Die Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften von Herzklappen oder im Rahmen von Tissue Engineering wurden bisher in der Literatur wenig beschrieben (18). Bei zyklischen Zugtestungen von Anssari-Benam et al. (103) zeigte sich, dass die getesteten porcinen Aortenklappen sich, genau wie in den hier beschriebenen Versuchen, in der Entlastungsphase nicht wieder auf ihrer Ausgangslänge verkürzt haben. Hierfür schienen entweder eine plastische Verformung oder Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene plausibel. Die Dehnung in der Entlastungsphase war bei gleicher Kraft höher als in der Belastungsphase, was zeigt, dass das Material trotz fehlender vollständiger Rückstellfähigkeit, weiterhin eine gewisse Elastizität aufweist (Abb. 24, Abb. 25). Dies ist ebenfalls in den Abbildungen von Anassari-Benam et al. ersichtlich. Hasan et al. (18) schließen daraus, dass der viskoelastische Effekt nicht mehr zu erkennen ist, da die Elastizität bei zyklischen Zugtestungen weniger abhängig ist von der Dehnungsgeschwindigkeit.

4.4 BEURTEILUNG DES PCL-MATERIALS ALS GERÜST FÜR ZUKÜNFTIGE HERZKLAPPENSEGEL

In dieser Arbeit erreichte natives PCL im Vergleich zu porcinen Pulmonalklappen nicht die gleichen mechanischen Eigenschaften. Allerdings wird es in anderen Quellen als optimales Material genannt, da es eine ähnliche Festigkeit und Steifigkeit wie humane Herzklappen habe (19,90). Letzten Endes soll es lediglich als Struktur und Grundgerüst für die darauf wachsenden Zellen dienen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MSCs auch ohne Beschichtung gut auf PCL kultiviert werden konnten, wodurch eine wichtige Eigenschaft eines optimalen Grundgerüsts für tissue-engineerte Klappen gegeben ist. Durch die Herstellung von EZM durch die Zellen sollten Zugfestigkeit und Elastizität einer tierischen oder humanen Herzklappe erreicht werden (1,3,18,89,99). Bei den hier beschriebenen Versuchen war der Untersuchungszeitraum vermutlich zu kurz, um einen Effekt durch gebildete EZM zu erkennen (58,100). Bei Untersuchungen über einen längeren Zeitraum sollte die Synthese von EZM im Rahmen der Materialbeurteilung evaluiert werden. Es bietet sich daher an, wie in anderen Arbeiten auch, weiterführend die Produktion von Extrazellulärmatrixkomponenten zu untersuchen, z.B. den Gehalt an Glykosaminoglykanen oder Kollagen; insbesondere auch im Hinblick auf die Passage der Zellen, da mit hoher Passage die Produktion eingeschränkt sein könne (88,89,91).

Zudem gibt es noch weitere mechanische Voraussetzungen, die ein adäquater Herzklappenersatz erfüllen muss, um eine physiologische Funktion zu gewährleisten. Es bietet sich an beispielsweise auch Biegeverformung und Materialermüdung zu untersuchen, was in weiteren Testungen evaluiert werden sollte (18).

PCL kann anisotrop hergestellt werden und somit den Aufbau einer Aortenklappe nachahmen. Bei Aortenklappen verläuft ein Großteil der Kollagenbündel in zirkumferentieller Richtung (4,18,19,105). Das hier verwendete PCL-Gewebe mit den willkürlich angeordneten Fasern ist nicht anisotrop. Dies zeigte sich auch bei Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des PCL-Gewebes (Abb. 2). Für Anisotropie müsste man PCL-Gewebe verwenden, in welchem die PCL-Fasern nur parallel zueinander angeordnet sind. Dennoch orientierten sich die pMSCs longitudinal und parallel zueinander, damit sind vermutlich auch die Kollagenfasern ebenso ausgerichtet, was für ein anisotropes Gewebe sprechen würde (1).

Des Weiteren gibt es bereits Herangehensweisen, auch beim Tissue Engineering möglichst die drei Schichten der Herzklappen zu imitieren, um durch einen möglichst anatomisch-korrekten Aufbau eine optimale Funktion zu erreichen. Hierfür könnte das hier verwendete, nicht anisotrope PCL-Gewebe (mit willkürlich ausgerichteten Fasern) auch in Kombination mit anderen Zellen, bspw. VICs (keine einheitliche Orientierung bei willkürlich angeordneten Fasern), wichtig sein, denn die Spongiosa ist nicht anisotrop. Ihre Fasern sind zufällig

angeordnet (45,89). Vermutlich sollte auch mehr als eine Zellart zur Besiedelung der tissue-engineerten Herzklappen genutzt werden, um der physiologischen Architektur möglichst nahe zu kommen (4,19).

4.4.1 BESIEDELUNGSART

In-situ sind unsere Herzklappen durch die ständige Herzaktion hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Tissue-engineerte Herzklappenprothesen müssen diesen Belastungen von Beginn an standhalten können (3). Daher gibt es die Versuche, bei denen die Zellen unter dynamischen Bedingungen kultiviert werden. Oft würden Bioreaktoren verwendet, um die mechanischen Belastungen, unter anderem die Pulswelle und den Blutdruck, zu simulieren (3,90). Die dynamische Besiedelung zeige eine bessere Migration der Zellen in die inneren Schichten des Materials und schnelleres Zellwachstum durch bessere Diffusion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten (58,90,100).

Engelmayr et al. (99) konnten zeigen, dass eine dynamische Besiedelung zu einer erhöhten Proliferationsrate und vermehrter EZM-Produktion der MSCs aus dem Knochenmark führte, was mutmaßlich an einer besseren Oxygenierung liegt. Allerdings zeigte sich die höchste Kollagenmenge pro Zelle bei den Vergleichsgruppen, die statisch oder nur unter zyklischer Flexion kultiviert wurden. Bei laminarem Fluss und gleichzeitiger zyklischer Flexion zeigte sich lediglich in absoluten Zahlen die höchste Menge an Kollagen. Die Kultivierung bei dynamischen Druckänderungen zwischen 5 und 30 mmHg führe vor allem zu mehr EZM-Produktion bei einer zusätzlich verbesserten Qualität des Gewebes. Die Zellproliferation sei hingegen geringer gewesen (3,100).

Zudem seien biomechanische Stimuli wichtig für die Differenzierung der MSCs in VICs (91). Zur schnellen Vaskularisation und raschen Besserung der Nährstoffversorgung gibt es das Verfahren, in das hergestellte Gewebe Wachstumsfaktoren, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), zu integrieren (106).

4.4.2 ABBAU

Für in-vivo Versuche und für solche, die eine längere Beobachtungsspanne haben, spielt auch die Abbaugeschwindigkeit des Grundgerüsts eine Rolle.

Der Abbau von PCL könne bis zu 4 Jahre dauern (82). Die Abbaugeschwindigkeit sei abhängig vom Molekulargewicht und der Verwendung des Materials (89). De Valence et al. (107) berichteten, dass nach 18 Monaten in-vivo noch ca. 1/5 des ursprünglichen Molekulargewichts des PCL-Materials vorhanden ist. Zudem ist die Abbaugeschwindigkeit abhängig von der Untersuchungsmethode. Bei einem Experiment von Bölgen et al. (108) wurde der Abbau in-vivo

durch subdermale Implantation in Ratten über definierte Zeitabstände analysiert. Hier zeigte sich ein Abfall des Molekulargewichts um 28 % nach 90 Tagen, wohingegen bei in-vitro Experimenten in Ringer-Lösung nach sechs Monaten das Molekulargewicht um nur 15 % gesunken war (108). Der Abbau des Polyesters könne durch im Serum und Nährmedien enthaltene Enzyme, beispielsweise Lipase, beschleunigt werden (58,109). In-vivo müsse zudem beachtet werden, dass die umgebenden Zellen abbauende Enzyme sezernieren und Makrophagen einwandern können, die zur Degradation des Materials beitrügen (58). Es sei überdies vorstellbar, dass die unmittelbare Nähe zum Blut und den darin enthaltenen Zellen die Abbaugeschwindigkeit bei Herzklappenprothesen erhöhe. Hier sind weitere langfristige Versuche nötig (58). Ein langsamer Abbau des Grundgerüsts ist für die Herstellung von Herzklappen, die einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wichtig. Durch einen zu schnellen Abbau könne die mechanische Stabilität des neu gebildeten Gewebes gefährdet werden, da die Zellen noch nicht genügend EZM gebildet hätten, um die dreidimensionale Struktur einer Herzklappe aufrechtzuerhalten. Beispielsweise wurde in einer Studie von Brugmans et al. (58) gezeigt, dass bei dem langsam degradierenden PCL nach sechs Wochen mehr EZM-Komponenten vorhanden waren, als bei Poly-4-hydroxybutyrate-beschichteter PGA.

4.5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Das ideale Gewebe für Tissue Engineering sollte Zelladhäsion und das Einwachsen der Zellen in die inneren Schichten des Gewebes ermöglichen und Diffusion von Nährstoffen und Transmittern gewährleisten können. Zusätzlich sollte es mechanische Zugfestigkeit bieten und gleichzeitig ausreichend flexibel sein (18,19,68). PCL-Gewebe besiedelt mit porcinen MSCs weist einige dieser Eigenschaften auf: Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wuchsen MSCs auch ohne Beschichtung auf dem Material, was sowohl für die Zelladhäsion als auch für eine adäquate Nährstoffdiffusion spricht. Ein Einwachsen in das Gewebe konnte hier und in anderen Quellen nachgewiesen werden (88,89). Ferner wird PCL langsam abgebaut, wodurch die Bildung von stabiler EZM unterstützt werde (58,82,107). MSCs können sich zu Fibroblasten differenzieren, welche in Herzklappengewebe für die EZM-Produktion verantwortlich sind (3,91). Um die mechanischen Eigenschaften einer Herzklappe zu erreichen, müssen Besiedelungsversuche über einen Zeitraum von mehr als drei Wochen durchgeführt werden. Die dann gebildete EZM sollte dann maßgeblich zur Widerstandsfähigkeit und Elastizität beitragen (58,100). Zudem zeige PCL im Gegensatz zu anderen Materialien keine Verringerung der Größe (i.S. einer Verdichtung) über einen Zeitraum von vier Wochen (58,88).

PCL hat den Vorteil, dass es bereits eine CE-Kennzeichnung sowie eine Zulassung der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration, FDA) für Medikamentenverabreichungssysteme hat (82,89). Hierdurch wird die zukünftige Zulassung von PCL-Herzklappen vereinfacht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Tissue-engineerte Herzklappen sollen die Probleme und Risiken der aktuellen Optionen für den Herzklappenersatz überwinden, da sie durch die vorhandenen vitalen Zellen Defekte reparieren können und bei Kindern mitwachsen können. Insbesondere elektrogenesponnene Gerüste aus bioresorbierbaren Polymeren scheinen ein perspektivisches Konzept für den Herzklappenersatz zu sein. Mesenchymale Stammzellen bieten sich für das Tissue Engineering von Herzklappen an, da sie das Potential besitzen zu ortsständigen, Extrazellulär-matrix-produzierenden Zellen zu differenzieren und die Gewinnung relativ unkompliziert erfolgen kann.

Material und Methoden: Porcine mesenchymale Stammzellen wurden statisch auf Polycaprolactone-Fasern kultiviert. Der Wachstumsverlauf auf unbeschichteten sowie mit Gelatine und MatriGel® beschichteten Polycaprolactone-Fasern wurde mittels Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie nach 1, 7, 14 und 21 Tagen analysiert und die mechanischen Eigenschaften nach 21 Tagen durch Zugversuche ermittelt.

Ergebnisse: An Tag 1 war die Adhäsion der porcinen mesenchymalen Stammzellen an den mit Gelatine beschichteten Polycaprolactone-Fasern signifikant erhöht, dieser Unterschied verschwand jedoch im weiteren Verlauf. Nach 7, 14 und 21 Tagen zeigte sich kein Unterschied in der Adhäsion und Proliferation der porcinen mesenchymalen Stammzellen an unbeschichteten und beschichteten Polycaprolactone-Fasern. Nach 21 Tagen war das Polycaprolactone-Gewebe vollständig besiedelt. Darüber hinaus konnte nach 21 Tagen Besiedlung eine Migration der porcinen mesenchymalen Stammzellen in das Polycaprolactone-Gewebe beobachtet werden. Die Zugtestungen zeigten signifikante Unterschiede zwischen besiedeltem Polycaprolactone-Gewebe und porcinem Pulmonalklappengewebe für Elastizitätsmodul, maximale Zugfestigkeit und Dehnungslänge, jedoch keine Unterschiede zwischen unbesiedelten und besiedelten Polycaprolactone-Geweben.

Diskussion: Polycaprolactone und darauf kultivierte porcine mesenchymale Stammzellen scheinen eine vielversprechende Grundlage für das Tissue Engineering von Herzklappen zu sein, da die porcinen mesenchymalen Stammzellen auf unbeschichteten Polycaprolactone-Fasern 1) eine geschlossene Zellschicht bildeten und 2) in das Polycaprolactone-Gewebe einwandern. In weiteren Untersuchungen sollte die Bildung von Extrazellulärmatrix der porcinen mesenchymalen Stammzellen in statischen und dynamischen Besiedelungsversuchen über einen längeren Zeitraum evaluiert werden. Zusätzlich sollten die Polycaprolactone-Gewebe in einem Bioreaktor besiedelt und unter physiologischen Bedingungen konditioniert werden, um anschließend hinsichtlich ihrer mechanischen und viskoelastischen Eigenschaften untersucht werden zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 5., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2015.
2. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus. Innere Organe - Lernatlas der Anatomie. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2015.
3. Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11(1):289–313.
4. Cheung DY, Duan B, Butcher JT. Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1155–72.
5. Iung B, Delgado V, Rosenhek R, Price S, Prendergast B, Wendler O, u. a. Contemporary presentation and management of valvular heart disease. *Circulation.* 2019;140(14):1156–69.
6. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, u. a. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the task force for the management of valvular heart disease of the european society of cardiology (ESC) and the european association for cardio-thoracic surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2021;43(7):561–632.
7. Deutsche Herzstiftung (Hrsg.). Deutscher Herzbericht 2020. Stuttgart: Thieme; 2021.
8. Cahill TJ, Prothero A, Wilson J, Kennedy A, Brubert J, Masters M, u. a. Community prevalence, mechanisms and outcome of mitral or tricuspid regurgitation. *Heart.* 2021;107(12):1003–9.
9. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, u. a. Global, regional, and national burden of calcific aortic valve and degenerative mitral valve diseases, 1990–2017. *Circulation.* 2020;141(21):1670–80.
10. Bertrand PB, Schwammenthal E, Levine RA, Vandervoort PM. Exercise dynamics in secondary mitral regurgitation: pathophysiology and therapeutic implications. *Circulation.* 2017;135(3):297–314.
11. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(11):685–94.
12. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet.* 2006;368(9540):1005–11.
13. Topilsky Y, Maltais S, Medina Inojosa J, Oguz D, Michelena H, Maalouf J, u. a. Burden of tricuspid regurgitation in patients diagnosed in the community setting. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019;12(3):433–42.
14. Schwedler G, Lindinger A, Lange PE, Sax U, Olchvary J, Peters B, u. a. Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in germany. *Clin Res Cardiol.* 2011;100(12):1111–7.
15. Speer C, Gahr M, Dötsch J (Hrsg.). Pädiatrie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin: Springer; 2019.

16. Glen S, Burns J, Bloomfield P. Prevalence and development of additional cardiac abnormalities in 1448 patients with congenital ventricular septal defects. *Heart*. 2004;90(11):1321–5.
17. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*. 2008;118(18):1864–80.
18. Hasan A, Ragaert K, Swieszkowski W, Selimović Š, Paul A, Camci-Unal G, u. a. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *J Biomech*. 2014;47(9):1949–63.
19. Tseng H, Puperi DS, Kim EJ, Ayoub S, Shah JV, Cuchiara ML, u. a. Anisotropic poly(ethylene glycol)/polycaprolactone hydrogel–fiber composites for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(19–20):2634–45.
20. Henne-Bruns D, Barth E (Hrsg.). *Duale Reihe Chirurgie*. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012.
21. Stanger O (Hrsg.). *Kompandium der modernen Herzchirurgie beim Erwachsenen: Entscheidungsgrundlagen für den verantwortlichen Herzchirurgen*. Wien: Springer; 2020.
22. Lemmer B, Fülgraff G, Brune K (Hrsg.). *Pharmakotherapie: klinische Pharmakologie: das Lehrbuch zum Querschnittsfach*. 14., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer; 2010.
23. Grunkemeier GL, Bodnar E. Comparison of structural valve failure among different models of homograft valves. *J Heart Valve Dis*. 1994;3(5):556–60.
24. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(4):439–65.
25. Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG, Oprian C, Kim T, Rahimtoola S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. *N Engl J Med*. 1993;328(18):1289–96.
26. Simionescu DT. Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(12):1971–85.
27. Angell WW, Angell JD, Sywak A. Selection of tissue or prosthetic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1977;73(1):43–53.
28. Buch WS, Pipkin RD, Hancock WD, Fogarty TJ. Mitral valve replacement with the Hancock stabilized glutaraldehyde valve: clinical and laboratory evaluation. *Arch Surg*. 1975;110(11):1408–15.
29. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol*. 1987;127(1):122.
30. Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers GF. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(4):999–1006; discussion 1007.

31. Forbess JM, Shah AS, St. Louis JD, Jagers JJ, Ungerleider RM. Cryopreserved homografts in the pulmonary position: determinants of durability. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(1):54–9.
32. Bonow RO, Lakatos E, Maron BJ, Epstein SE. Serial long-term assessment of the natural history of asymptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular systolic function. *Circulation.* 1991;84(4):1625–35.
33. Hopkins R. From cadaver harvested homograft valves to tissue-engineered valve conduits. *Prog Pediatr Cardiol.* 2006;21(2):137–52.
34. Juthier F, Vincentelli A, Pinçon C, Banfi C, Ennezat PV, Maréchaux S, u. a. Reoperation after the ross procedure: incidence, management, and survival. *Ann Thorac Surg.* 2012;93(2):598–605.
35. Blackman DJ, Saraf S, MacCarthy PA, Myat A, Anderson SG, Malkin CJ, u. a. Long-term durability of transcatheter aortic valve prostheses. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(5):537–45.
36. Rogers JH, Franzen O. Percutaneous edge-to-edge mitralclip therapy in the management of mitral regurgitation. *Eur Heart J.* 2011;32(19):2350–7.
37. Feldman T, Wasserman HS, Herrmann HC, Gray W, Block PC, Whitlow P, u. a. Percutaneous mitral valve repair using the edge-to-edge technique: six-month results of the everest phase I clinical trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(11):2134–40.
38. Van de Veire NR, Braun J, Delgado V, Versteegh MIM, Dion RA, Klautz RJM, u. a. Tricuspid annuloplasty prevents right ventricular dilatation and progression of tricuspid regurgitation in patients with tricuspid annular dilatation undergoing mitral valve repair. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;141(6):1431–9.
39. Kouchoukos NT, Davila-Roman VG, Spray TL, Murphy SF, Perrillo JB. Replacement of the aortic root with a pulmonary autograft in children and young adults with aortic-valve disease. *N Engl J Med.* 1994;330(1):1–6.
40. Kouchoukos NT, Masetti P, Nickerson NJ, Castner CF, Shannon WD, Dávila-Román VG. The ross procedure: long-term clinical and echocardiographic follow-up. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(3):773–81.
41. Clarke DR. Presidential address: value, viability, and valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(1):1–6.
42. Deutsche Stiftung Organtransplantation (Hrsg.). Jahresbericht - Organspende und Transplantation in Deutschland 2020. Frankfurt/Main; 2021.
43. Chapekar MS. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(6):617–20.
44. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, u. a. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation.* 2000;102(suppl_3):lii–22.
45. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, u. a. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 2000;102(suppl_3):lii–44.
46. Nachlas ALY, Li S, Davis ME. Developing a clinically relevant tissue engineered heart valve-a review of current approaches. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(24):1700918.

47. Chen SC, Mullon C, Kahaku E, Watanabe F, Hewitt W, Eguchi S, u. a. Treatment of severe liver failure with a bioartificial liver. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;831(1):350–60.
48. Neuzil DF, Rozga J, Moscioni AD, Ro MS, Hakim R, Arnaout WS, u. a. Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency. *Surgery.* 1993;113(3):340–3.
49. Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, McLaughlin BJ. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng.* 1999;5(3):187–96.
50. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FNL, Malaviya P, Huibregtse B, u. a. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng.* 1999;5(3):267–77.
51. Zaulyanov L, Kirsner RS. A review of a bi-layered living cell treatment (apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging.* 2007;2(1):93–8.
52. Browne JE, Anderson AF, Arciero R, Mandelbaum B, Moseley JBJ, Micheli LJ, u. a. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;436:237–45.
53. Sutherland FWH, Perry TE, Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, u. a. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation.* 2005;111(21):2783–91.
54. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2010;28(3):585–96.
55. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci Mater Med.* 1992;3(6):432–46.
56. Harken DE, Taylor WJ, Lefemine AA, Lunzer S, Low HBC, Cohen ML, u. a. Aortic valve replacement with a gaged ball valve. *Am J Cardiol.* 1962;9(2):292–9.
57. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4–5):242–68.
58. Brugmans MMCP, Soekhradj-Soechit RS, van Geemen D, Cox M, Bouten CVC, Baaijens FPT, u. a. Superior tissue evolution in slow-degrading scaffolds for valvular tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(1–2):123–32.
59. Aldous IG, Veres SP, Jahangir A, Lee JM. Differences in collagen cross-linking between the four valves of the bovine heart: a possible role in adaptation to mechanical fatigue. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2009;296(6):H1898–906.
60. Wei X, Yang X, Han Z peng, Qu F fang, Shao L, Shi Y fang. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):747–54.
61. Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230–47.
62. Horwitz E, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, u. a. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393–5.
63. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci.* 1991;99(1):131–9.

64. Bianco P, Costantini M, Dearden LC, Bonucci E. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol.* 1988;68(4):401–3.
65. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1663–8.
66. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, u. a. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003;5(12):1028–38.
67. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726–36.
68. Boland ED, Wnek GE, Simpson DG, Pawlowski KJ, Bowlin GL. Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of poly (glycolic acid) electrospinning. *J Macromol Sci Part A.* 2001;38(12):1231–43.
69. Boroumand S, Asadpour S, Akbarzadeh A, Faridi-Majidi R, Ghanbari H. Heart valve tissue engineering: an overview of heart valve decellularization processes. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0061> [Internet]. 2018 [zitiert 13. Januar 2022];13(1). Verfügbar unter: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/rme-2017-0061>
70. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675–83.
71. Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, u. a. Hemodynamic characteristics of the matrix p decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the ross operation. *J Heart Valve Dis.* 2005;14(1):78–81.
72. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, u. a. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2003;23(6):1002–6; discussion 1006.
73. Perri G, Polito A, Esposito C, Albanese SB, Francalanci P, Pongiglione G, u. a. Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular out-flow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2012;41(6):1320–5.
74. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, u. a. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 1994;12(7):689–93.
75. Engelmayer GC Jr, Sacks MS. A structural model for the flexural mechanics of nonwoven tissue engineering scaffolds. *J Biomech Eng.* 2006;128(4):610–22.
76. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(12):2077–82.
77. Gibson P, Schreuder-Gibson H, Rivin D. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2001;187–188:469–81.
78. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat.* 1995;35(2):151–60.

79. Koleske JV. Blends containing poly (ϵ -caprolactone) and related polymers. In: Polymer blends. Elsevier; 1978. S. 369–89.
80. Lam CXF, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA, Teoh SH. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90A(3):906–19.
81. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm*. 2004;278(1):1–23.
82. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010;35(10):1217–56.
83. Langer R, Peppas N. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *J Macromol Sci Part C*. 1983;23(1):61–126.
84. Lutter G, Puehler T, Cyganek L, Seiler J, Rogler A, Herberth T, u. a. Biodegradable poly- ϵ -caprolactone scaffolds with ECFCs and iMSCs for tissue-engineered heart valves. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1):527.
85. Cell Biologics, Inc (Hrsg.). Porcine bone marrow mesenchymal stem cells (PMSC) protocol. Chicago; 2023 [Verfügbar unter: https://cellbiologics.com/index.php?route=product/product&path=2_56_386&product_id=22153, zitiert: 25. Oktober 2023]
86. Viapiano M. Procedures to culture and analyze cells on nanofiber scaffolds. Boston MA. [Verfügbar unter: http://www.viapianolab.org/Stored-Files/Vlab_protocol_nanofibers.pdf, zitiert: 18. Dezember 2021]
87. Safwani WKZW, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;166(8):2101–13.
88. Brugmans MMCP, Driessen-Mol A, Rubbens MP, Cox MAJ, Baaijens FPT. Poly- ϵ -caprolactone scaffold and reduced in vitro cell culture: beneficial effect on compaction and improved valvular tissue formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(12):E289–301.
89. Jana S, Lerman A. Behavior of valvular interstitial cells on trilayered nanofibrous substrate mimicking morphologies of heart valve leaflet. *Acta Biomater*. 2019;85:142–56.
90. Hasan A, Soliman S, Hajj FE, Tseng YT, Yalcin HC, Marei HE. Fabrication and in vitro characterization of a tissue engineered PCL-PLLA heart valve. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
91. Duan B, Hockaday LA, Das S, Xu C, Butcher JT. Comparison of mesenchymal stem cell source differentiation toward human pediatric aortic valve interstitial cells within 3D engineered matrices. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(8):795–807.
92. Mol A, Smits AI, Bouten CV, Baaijens FP. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(3):259–75.
93. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NFkB- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2008;294(3):C675–82.

94. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, u. a. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
95. Febraro F, Chen M, Denham M. Generation of human iPSCs by episomal reprogramming of skin fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2021;2239:135–51.
96. Krüger-Genge A, Dietze S, Yan W, Liu Y, Fang L, Kratz K, u. a. Endothelial cell migration, adhesion and proliferation on different polymeric substrates. Park JW, Krüger A, Jung F, Herausgeber. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2019;70(4):511–29.
97. Grinnell F, Milam M, Srere PA. Studies on cell adhesion: II. adhesion of cells to surfaces of diverse chemical composition and inhibition of adhesion by sulfhydryl binding reagents. *Arch Biochem Biophys*. 1972;153(1):193–8.
98. Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*. 1989;9(4):535–41.
99. Engelmayer GC, Sales VL, Mayer JE, Sacks MS. Cyclic flexure and laminar flow synergistically accelerate mesenchymal stem cell-mediated engineered tissue formation: Implications for engineered heart valve tissues. *Biomaterials*. 2006;27(36):6083–95.
100. Mol A, Rutten MCM, Driessen NJB, Bouten CVC, Zünd G, Baaijens FPT, u. a. Autologous human tissue-engineered heart valves. *Circulation*. 2006;114(1_supplement):I–152.
101. Sauren AAHJ, van Hout MC, van Steenhoven AA, Veldpaus FE, Janssen JD. The mechanical properties of porcine aortic valve tissues. *J Biomech*. 1983;16(5):327–37.
102. Balguid A, Rubbens MP, Mol A, Bank RA, Bogers AJJC, van Kats JP, u. a. The role of collagen cross-links in biomechanical behavior of human aortic heart valve leaflets—relevance for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007;13(7):1501–11.
103. Anssari-Benam A, Bader DL, Screen HRC. A combined experimental and modelling approach to aortic valve viscoelasticity in tensile deformation. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(2):253–62.
104. Stradins P, Lacis R, Ozolanta I, Purina B, Ose V, Feldmane L, u. a. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;26(3):634–9.
105. Lee JM, Courtman DW, Boughner DR. The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. I. tensile viscoelastic properties of the fresh leaflet material. *J Biomed Mater Res*. 1984;18(1):61–77.
106. Peters MC, Isenberg BC, Rowley JA, Mooney DJ. Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(12):1267–78.
107. de Valence S, Tille JC, Mugnai D, Mrowczynski W, Gurny R, Möller M, u. a. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*. 2012;33(1):38–47.

108. Bölgen N, Menceloğlu YZ, Acatay K, Vargel İ, Pişkin E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly (ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2005;16(12):1537–55.
109. Zeng J, Chen X, Liang Q, Xu X, Jing X. Enzymatic degradation of poly(l-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Macromol Biosci.* 2004;4(12):1118–25.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unbesiedelten PCL NanoECM-Plattenböden in zwei verschiedenen Vergrößerungen.....	15
Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unbesiedelten Gewebestücke in zwei verschiedenen Vergrößerungen von beiden Seiten.....	15
Abb. 3: Versuchsaufbau 24-Well PCL NanoECM-Platte	21
Abb. 4: Materialfehler.	23
Abb. 5: Materialfehler.	23
Abb. 6: Zugtestung eines PCL-Gewebestücks.....	25
Abb. 7: Raster- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der unbeschichteten besiedelten Platten an Tag 1, 7, 14 und 21 in zwei verschiedenen Vergrößerungen am REM	28
Abb. 8: Box-Plot-Whisker-Diagramm der Zellmengen der lebenden Zellen/cm ² auf den Platten nach Tagen und Beschichtungen	29
Abb. 9: Box-Plot-Whisker-Diagramm der Zellmengen der toten Zellen/cm ² auf den Platten nach Tagen und Beschichtungen	30
Abb. 10: Box-Plot-Whisker-Diagramm der prozentualen Anteile an toten Zellen an der Gesamtheit aller Zellen auf den Platten nach Tagen und Beschichtungen	30
Abb. 11: Raster- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Gelatine beschichteten Platten an Tag 1, 7, 14 und 21 in zwei verschiedenen Vergrößerungen am REM	31
Abb. 12: Raster- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit MatriGel® beschichteten besiedelten Platten an Tag 1, 7, 14 und 21 in zwei verschiedenen Vergrößerungen am REM	32
Abb. 13: Wachstum (prozentual) im Vergleich zum vorherigen Messzeitpunkt unterteilt nach Beschichtungsarten, berechnet aus Mittelwerten.....	35
Abb. 14: Wachstum (prozentual) im Vergleich zum vorherigen Messzeitpunkt unterteilt nach Beschichtungsarten, berechnet aus Medianen	35
Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberseite der besiedelten Gewebestücke an Tag 7, 14 und 21 in zwei verschiedenen Vergrößerungen.....	37
Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Unterseite der besiedelten Gewebestücke an Tag 7, 14 und 21 in zwei verschiedenen Vergrößerungen.....	38
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Schichtbilder eines Gewebestückes an Tag 7.....	39
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Schichtbilder eines Gewebestückes an Tag 14.....	40
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Schichtbilder eines Gewebestückes an Tag 21.....	41
Abb. 20: Box-Plot-Whisker-Diagramm der Elastizitätsmodule der verschiedenen Proben bei einfachen Zugtestungen	42

Abb. 21: Box-Plot-Whisker-Diagramm der maximalen Zugfestigkeit in Newton der verschiedenen Proben bei einfachen Zugtestungen	43
Abb. 22: Box-Plot-Whisker-Diagramm der prozentualen Dehnung bei maximaler Zugkraft der verschiedenen Proben bei einfachen Zugtestungen	44
Abb. 23: Box-Plot-Whisker-Diagramm der prozentualen Dehnung bei maximaler Zugkraft der verschiedenen Proben bei zyklischen Zugtestungen.	46
Abb. 24: Hysteresekurven aller PCL-Gewebestücke bei dynamischen Zugtestungen in neun Zyklen mit ansteigender Kraft in 0,05 N-Schritten von 0,05 auf 0,45 N.....	46
Abb. 25: Hysteresekurve einer repräsentativen Probe bei dynamischen Zugtestungen in neun Zyklen mit ansteigender Kraft in 0,05 N-Schritten von 0,05 auf 0,45 N.	47

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Volumen des Mediums bei unterschiedlichen Well-Platten und Wellgrößen	17
Tab. 2: Exzitations- und Emissionsspektren der gewählten Kanäle am IMAGE Cytometer ...	21
Tab. 3: Zellmengen aller Zellen und der toten Zellen unterteilt nach den verschiedenen Beschichtungen an Tag 1, 7, 14, 21 sowie prozentuale Anteile der toten Zellen an allen Zellen	33
Tab. 4: Elastizitätsmodul, maximale Zugfestigkeit und Dehnungslänge bei maximaler Zugkraft für besiedelte und unbesiedelte PCL-Gewebestücke sowie radial und zirkumferentiell getestete porcine Pulmonalklappensegel aus Daten der einfachen Zugtestung	42
Tab. 5: Maximale Zugkraft und Dehnungslänge bei maximaler Zugkraft für besiedelte und unbesiedelte PCL-Gewebestücke aus Daten der zyklischen Zugtestung.....	45
Tab. 6: Umrechnung der Werte für die Zugfestigkeit von Newton in Megapascal	54

9 PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Lutter G, Puehler T, Cyganek L, Seiler J, Rogler A, Herberth T, Knueppel, P, Gorb, SN, Sathanathan, J, Sellers, S, Müller, OJ, Frank, D, Haben, I. **Biodegradable poly- ϵ -caprolactone scaffolds with ECFCs and iMSCs for tissue-engineered heart valves.** Int J Mol Sci. 2022; 23(1): 527. (84)

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Gregor Warnecke, Direktor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel sowie Prof. Dr. med. Jochen Cremer ehemaliger Direktor der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie für die Möglichkeit, in ihrer Abteilung promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Lutter danke ich vielmals für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die stets freundliche und zuverlässige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie die Erreichbarkeit bei Fragen und Problemen.

Ebenso möchte ich Frau Dr. rer. nat. Irma Kollenda für die Unterstützung bei der Themenfindung und die Betreuung während des gesamten Prozesses, insbesondere während der Ausarbeitung danken. Dank ihren Verbesserungsvorschlägen und Korrekturen ist diese Arbeit zu dem geworden, was hier zu lesen ist.

Mein sehr großer Dank gilt auch Frau Jette Seiler für die geduldige Einarbeitung in die Laborprozesse und -abläufe, die Hilfe bei der Planung der Versuche und das stets offene Ohr bei Problemen. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können und habe mich immer über ihre Gesellschaft gefreut.

Ich danke allen, die meine Entwürfe Korrektur gelesen, mit neuen Ideen für meine auftauchenden Probleme geholfen, mir bei Fragen zur Seite gestanden und mich auf dieser Reise begleitet haben. Insbesondere möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat, auch wenn sie manchmal nicht genau wusste, was ich hier mache.

Zudem möchte ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gorb, Wiebe Schäfer von Synentec sowie Dr. Ulf Geisen danken, für die Möglichkeit das Rasterelektronen- bzw. Fluoreszenzmikroskop zu nutzen sowie für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Verwendung.