

2 Material und Methoden

2.1 Polymerkonstrukte

Für diese Arbeit wird ein neues Polymerkonstrukt für das TE von alveolärem Gewebe entwickelt, in das ein nach physiologischen Maßgaben entworfenes Kapillarnetz integriert ist, über das die Versorgung eines TE-Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff erreicht werden kann. Bei dem verwendeten Polymer für die Zweikammersysteme handelt es sich um biokompatibles PDMS. PDMS ist ein transparentes Elastomer auf Silikonbasis. Es ist chemisch inert und zeichnet sich durch gute Charakteristiken für die Zellkultur aus ¹¹³. Die Polymerkonstrukte haben eine Länge von 7 cm, eine Breite von 3 cm und eine Höhe von weniger als 1 cm.

Abb. 2

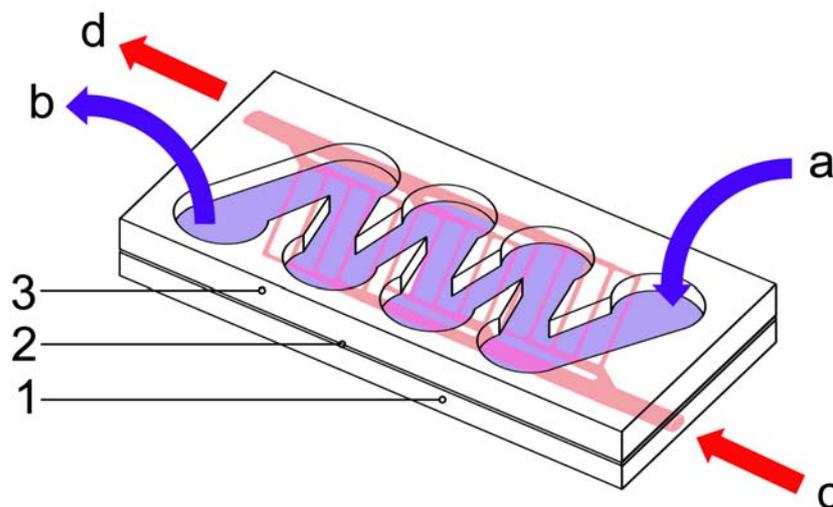


Abbildung 2 – Zweikammersystem (schematisch)

Polymerkonstrukt bestehend aus Gefäßsystem (1), das mittels einer PC Membran (2) von der parenchymalen Kammer (3) getrennt ist. Die zwei Kompartimente besitzen jeweils einen separaten Zulauf (a, c) und einen Ablauf (b, d).

Die parenchymale Kammer ist durch eine *polycarbonate* (im Folgenden PC) - Membran vom angrenzenden Gefäßsystem getrennt. PC ist ein hochporöses Polymer, das sich durch hydrophile Eigenschaften auszeichnet. Für die Polymerkonstrukte wurden 10 µm starke Membranen mit einer mittlere Porengröße von 0,1 µm verwendet. Dadurch wird der Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen zwischen den zwei Kammern mittels Diffusion ermöglicht. Die 2 Kammern weisen jeweils eine unterschiedliche Form und Struktur auf, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Abb. 3



Abbildung 3 – Zweikammersystem aus PDMS

Polymerkonstrukt mit den jeweiligen Zu- und Abläufen für das vaskuläre und das parenchymale Kompartiment. (Maßbalken 1 cm)

2.1.1 Vaskuläres Kompartiment

Das vaskuläre Kompartiment liegt unterhalb der PC Membran und besteht aus einem feinen im zweidimensionalen Raum aufgespannten Netzwerk sich verzweigender Kanäle. Das Netzwerk gleicht einem physiologischen Kapillarsystem von menschlichen Geweben und besteht aus feinen Gefäßstrukturen mit einem Durchmesser von 35 µm

bis zu 2 mm. Die Kanäle haben durch abgerundete Ecken einen annähernd halbrunden Querschnitt. Abbildung 4 und 5 zeigen den geometrischen Aufbau des Gefäßsystems.

Abb. 4

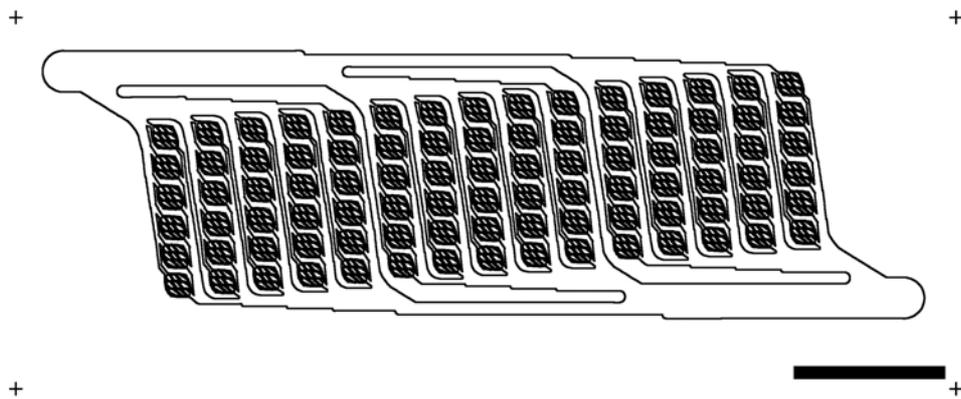


Abbildung 4 – Design des Gefäßsystems

Ein nach physiologischen Maßgaben erstelltes Design für das Gefäßsystem in den Polymerkonstrukten. Maßstab 2 : 1 (Maßbalken 1 cm)

Das Design des vaskulären Kompartimentes wurde mit Hilfe eines speziell für dieses Forschungsvorhaben entwickelten Computeralgorithmus am *Department of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technology* entworfen ¹¹⁴. Mit diesem Algorithmus kann der Effekt unterschiedlicher geometrischer Konfigurationen auf die Hämodynamik und Verteilung des Blutflusses in Gefäßsystemen simuliert werden. Hierbei werden die rheologischen Fließeigenschaften von Blut und seine Zusammensetzung aus flüssigen und korpuskulären Bestandteilen berücksichtigt (Hämatokrit). Das Gefäßsystem wird dabei durch dynamische Anpassung der geometrischen Struktur an haemodynamische Eigenschaften, wie Flussgeschwindigkeit, Druck und Scherspannung entwickelt, die sich innerhalb der Gefäße bei simulierter Perfusion mit Blut in Abhängigkeit vom Aufbau des jeweiligen

Gefäßabschnittes verändern. Dieses Verfahren ermöglicht es, ein Gefäßsystem mit den erforderlichen Abmessungen nach physiologischen Maßgaben zu entwerfen.

Abb. 5

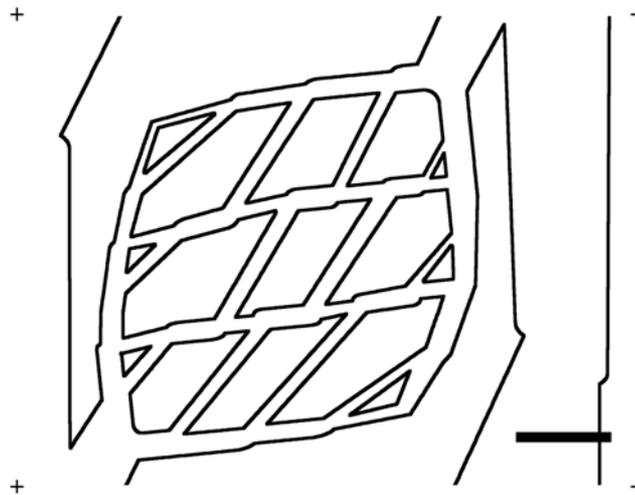


Abbildung 5 – Design des Gefäßsystems (Ausschnitt)

Vergrößerter Ausschnitt des nach physiologischen Maßgaben erstellten Designs für das Gefäßsystem in den Polymerkonstrukten. Maßstab 25 : 1 (Maßbalken 500 µm)

2.1.1.1 Mikrosystemtechnik

Bei der Übertragung des Gefäßsystems in PDMS kommen Techniken aus dem Bereich der *micro-electro-mechanical systems* (im Folgenden *MEMS*) zur Anwendung. Mittels Photolithographie wird eine dreidimensionale Abgussform des nach dem beschriebenen Verfahren entworfene Design des Gefäßsystems aus Silikon hergestellt. In einem ersten Arbeitsschritt wird dafür ein 4 inch Silizium-*wafers* mit einer dünnen Schicht (2 µm) eines Negativ-Photolacks bedampft. Der Photolack besteht aus einem alkalisch löslichen Novolac-Harz und einem photosensitiven Lösungsinhibitor (im Folgenden *PAC*). Durch Anwesenheit des *PAC* wird die Lösung des Novolac-Harzes in alkalischen

Lösungsmitteln verhindert. Einer UV Exposition bewirkt den photochemische Zerfall des *PAC* und überführt so den Photolack in seine lösliche Form. Eine Photomaske mit dem auf den *wafer* zu übertragenden Design des Gefäßsystems wird auf die Scheibe aufgelegt und deckt so einen Teil der belackten *wafer*-Oberfläche ab. Da die Photomaske bei der Kontaktbelichtung dem Photolack unmittelbar aufliegt, kann eine Detailauflösungen von weniger als 0,1 µm erreicht werden. Bei einer Belichtung mit UV-Licht werden die durch die gewünschten Areale des Photolacks durch die Maske geschützt. Die belichteten Anteile des Photolacks werden im Anschluss mit einer alkalischen Entwicklerlösung entfernt. Nach Aushärtung bildet der verbliebene Photolack eine Maske für den folgenden Trockenätzprozess. Hierbei wird das gewünschte Design des Gefäßnetzwerkes durch reaktive Ionen verschiedener Entwicklergase in den *wafer* eingätzt (*deep reactive ion etching, DRIE*). Areale des *wafers*, die nicht mehr mit dem Photolack bedeckt sind, werden hierbei durch die Einwirkung reaktiver Silizium-Ionen schrittweise von der Oberfläche abgetragen. Wie tief das Muster eingätzt wird, kann durch die Einwirkungsdauer der Silizium-Ionen gesteuert werden.

Um bei der weiteren Verarbeitung der *wafer* ein zu starkes Anhaften von PDMS an der Oberfläche zu verhindern, wird abschließend eine Oberflächenneutralisierung (*passivation*) durchgeführt. Die auf diese Weise hergestellten *wafer* enthalten das exakte dreidimensionale Abbild der jeweiligen Photomaske und werden als Abgussform für die PDMS Bauteile der Polymerkonstrukte verwendet.

Abb. 6

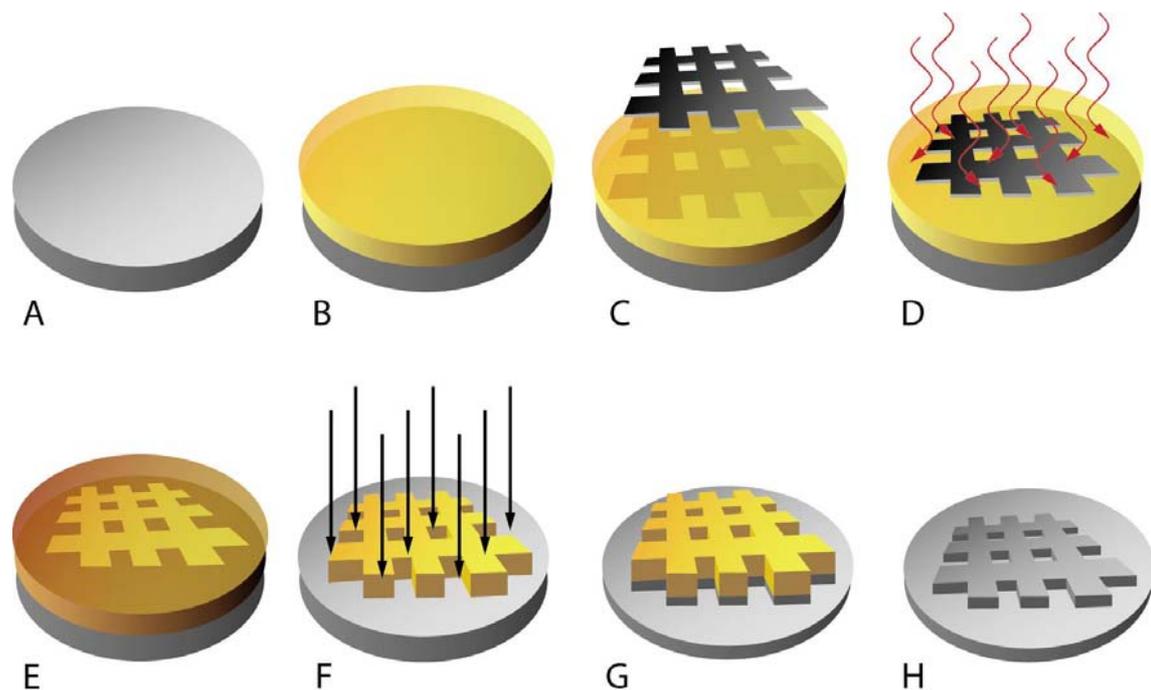


Abbildung 6 – Photolithographie und DRIE

Der Silizium-*wafer* (A) wird mit Photolack bedampft (B). Nach Aufsetzen einer Photomaske (C) wird der *wafer* mit einer UV-Lampe belichtet (D). Hierdurch ändert der exponierte Photolack seine chemische Struktur (E) und wird mit einer alkalischen Entwicklerlösung abgelöst. Mit *DRIE* (F) wird das Muster in den Silizium-*wafer* eingetätzt (G). Der restliche Photolack wird abgelöst (H).

Modifiziert nach Vozzi G. et al.; Biomaterials 24 (2003); 2533 - 2540¹¹⁵

Für das vaskuläre Kompartiment der Zweikammersysteme werden PDMS Abgüsse in einer Stärke von 5 mm hergestellt. Dies erfolgt durch Auftragen des PDMS (Sylgard 184 Elastomer, Gewichtsverhältnis von Grundsubstanz zu Härter-Lösung 10:1) auf die Abgussform (*wafer* mit dem negativen Abdruck des Gefäßsystems). Aufgrund seiner hohen Adhäsivität verteilt sich das PDMS mit großer Abbildungspräzision über die Oberfläche der Abgussvorlage. Nach einer Trockenzeit von 24 h bei 50 °C ist ein unkompliziertes Ablösen des PDMS mit einem genauen Abdruck des Gefäßsystems von der Gussform möglich. In Abbildung 7 ist ein *wafer* mit dem negativen Abdruck des Gefäßsystems für vaskuläre Kompartimente der Polymerkonstrukte dargestellt.

Abb. 7

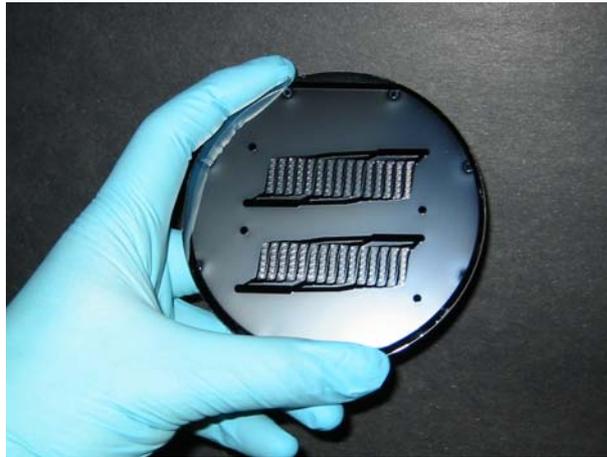


Abbildung 7 – Silizium-wafer

4 inch Silizium-wafer nach Oberflächenstrukturierung mit dem negativen Abdruck zweier Gefäßsysteme für die Polymerkonstrukte.

Abbildung 8 zeigt den Abdruck des Gefäßsystems in PDMS mit Öffnungen für den Zu- und Ablauf an den Stirnseiten.

Abb. 8

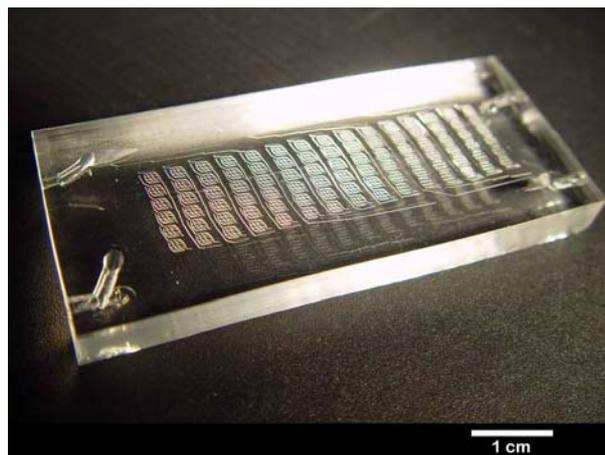


Abbildung 8 – Gefäßsystem in PDMS

Vaskuläre Kompartiment des Polymerkonstruktes.
(Maßbalken 1 cm)

2.1.2 Parenchymales Kompartiment

Für die Kultivierung von parenchymalen Zellen ist innerhalb des Polymerkonstruktes ein zweites Kompartiment integriert. Dieses parenchymale Kompartiment ist ein weiter dreidimensionaler Raum für die Proliferation der besiedelten Zellen. Sie ist durch die PC-Membran vom Gefäßsystem getrennt und hat eine geschlängelte Form. Das geschlungene Design gewährleistet eine gleichmäßige Höhe der Kammer über ihre gesamte Ausdehnung. Außerdem wird durch die spezielle Form eine gleichförmige Verteilung der besiedelten Zellen über die Fläche der Kammer begünstigt. Es hat eine Fläche von 8,9 cm².

Abb. 9

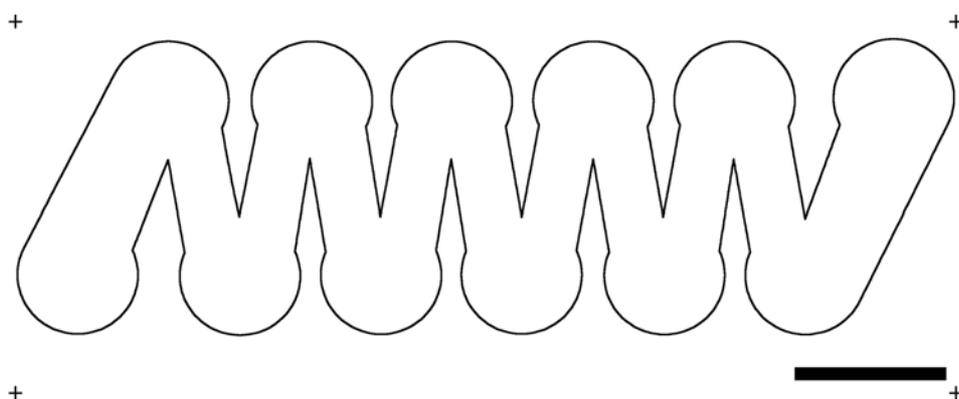


Abbildung 9 – Parenchymales Kompartiment

Design des parenchymalen Kompartimentes.
Maßstab 2 : 1 (Maßbalken 1 cm)

Um eine einheitliche Höhe der Kammer zu erreichen, wird PDMS mittels Zentrifugalbeschichtung (Rotationsgeschwindigkeit 20 U/s) auf den Boden einer Petrischale aufgetragen. Über die Dauer der Rotationsbeschichtung kann die Stärke der entstehenden Membran gesteuert werden. Für das parenchymale Kompartiment

werden Membranen mit einer Stärke von ca. 330 µm gewählt. Das geschlungene Design wird mittels Biopsiestanzen aus der PDMS Membran herausgeschnitten. Die so hergestellte Seitenbegrenzung der parenchymalen Kammer wird mit einer Deckplatte verbunden. Das entstehende Kompartiment hat damit eine Höhe von 330 µm und ein Volumen von ca. 294 mm³ (ca. 294 µl).

Die Polymerkonstrukte werden mittels einer Sauerstoff Plasma Technik aus den 2 PDMS Hälften zusammengesetzt (Technics, Inc., Dublin CA, USA). Bei diesem Prozess werden die Oberflächen des PDMS mittels eines Sauerstoffplasmas oxidiert. Beim Kontakt kommt es über die Bildung von Si-OH Gruppen zur Ausbildung einer irreversiblen Verbindung zwischen den Kontaktflächen. Die PC Membran wird hierfür zwischen den beiden PDMS Hälften mit Silikon Klebstoff (3140, Dow Corning Corp., Midland MI, USA) fixiert. Beide Kammern werden mit je einen separaten Zu- und Ablauf aus feinen Silikonschläuchen mit einem Innendurchmesser von 0,76 mm und einem Außendurchmesser von 1,65 mm (Silastic, Dow Corning Corp., Midland MI, USA) bestückt. Zur leichten Handhabung werden die Schläuche mit *Luer* Konnektoren versehen. Vor der Besiedelung werden die Polymerkonstrukte bei 25 °C mit Ethylenoxid (im Folgenden EO) sterilisiert und anschließend bis zur Verwendung zur vollständigen Ausdunstung für mindestens 48 Stunden in einem Vakuumcontainer gelagert.

2.2 Zellkultur

Die Arbeitsschritte der Zellkultur im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit werden gemäß den üblichen Bestimmungen für den Umgang und die Kultur von Zellen und lebenden Geweben durchgeführt. Alle Arbeitsgänge der Zellkultur und *in vitro* Konditionierung werden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Zur Anwendung

kommen dabei Sicherheitswerkbänke der Klasse 2 mit vertikaler laminarer Luftströmung (Sterilgard Hood Typ A/B3) und Inkubatoren (Forma Scientific Typ3110) mit den für die Zellkultur üblichen Bedingungen von 5 % CO₂, 37 °C und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit.

2.2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit werden 2 unterschiedliche Zelltypen verwendet: Im parenchymalen Kompartiment werden Alveolarepithelzellen kultiviert, wohingegen das Gefäßsystem des vaskulären Kompartimentes mit Endothelzellen besiedelt wird.

Die verwendeten parenchymalen Zellen entstammen der Zelllinie MLE-12 (CRL-2110, ATCC, Manassas VA, USA). Sie wurde 1992 von K. A. Wikenheiser aus einem alveolären Tumor transgener Mäuse entwickelt und mittels SV40 Antigen immortalisiert. Histologisch handelt es sich hierbei um Zellen epithelialen Ursprungs, die adhärent wachsen. Als Zellprodukte sind Bestandteile des Surfactant bekannt. Bei Surfactant handelt es sich um einen Flüssigkeitsfilm, der die innere Oberfläche von Alveolen auskleidet. Es enthält ein Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden und vier spezifischen Surfactant assoziierten Proteinen (im Folgenden SP-A bzw. SP-B, SP-C und SP-D). Surfactant verhindert einen Kollaps der Alveolen während der Expiration indem es die Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase reduziert. Die verwendete Zelllinie MLE-12 wird durch die Expression von SP-B und SP-C charakterisiert. Aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften mit Alveolarepithelzellen vom Typ II werden MLE-12 Zellen unter anderem als Modell zur Untersuchung der zellulären Synthese von Bestandteilen des Surfactant verwendet.

Für die Zellkultur der MLE-12 Zellen wird ein als „HITES Medium“ bezeichnetes Kulturmedium mit 2 % fetalem Rinderserum (im Folgende FBS) (Gibco, Invitrogen Corp, Carlsbad CA, USA) und 1 % Penicillin-Streptomycin-Glutamin (im Folgenden GPS) (Sigma, St Louis MO, USA) verwendet. Das HITES Medium wird durch Mischung in gleichen Anteilen von *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (im Folgenden DMEM) und Ham's F-12 Medium (beide Gibco, Invitrogen Corp, Carlsbad CA, USA) mit 0,005 mg/ml Insulin, 0,01 mg/ml Apo-Transferrin, 30 nM Natrium Selenit, 10 nM Hydrocortison, 10 nM Beta-Estradiol, 10 nM HEPES-Puffer (alle Sigma, St. Louis MO, USA) und 1 nM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) hergestellt.

Abb. 10

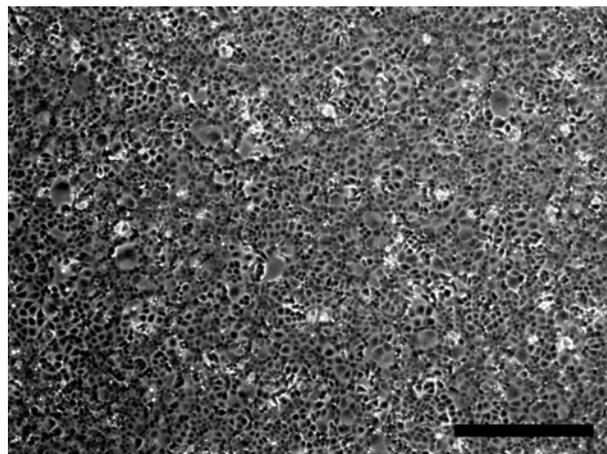


Abbildung 10 – MLE-12 Zellen

Konfluentes Monolayer MLE-12 Zellen auf *polystyrene*.
Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

Aufgrund der hohen Verdopplungsrate werden die Zellen alle 72 Stunden mit einer durchschnittlichen Subkultivierungsrate von 1:4 unter Verwendung von 0,05 % Trypsin (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) passagiert. Das Kulturmedium wird täglich gewechselt.

Die Besiedelung der Gefäßsysteme der vaskulären Kompartimente erfolgt mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Zelllinie HMEC-1 (im Folgenden HMECs). Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie von Endothelzellen aus Kapillargefäßen menschlicher Hautbiopsien^{116 - 120}. Insbesondere bei der Regulation des Zellwachstums und -differenzierung und der Expression von Adhäsionsmolekülen bestehen deutliche Unterschiede zwischen Endothelzellen aus großen Blutgefäßen (z.B. Nabelschnurgefäße) und mikrovaskulären Endothelzellen¹²¹. Zur Charakterisierung der HMECs dient eine immunhistochemische Färbung der Zellen mit CD31. Bei CD31 handelt es sich um ein charakteristisches Membranprotein der Zellmembran von Endothelzellen. Es kann bei der Kultur von Endothelzellen zur Überprüfung verwendet werden, inwieweit die Differenzierung als Endothelzellen der Zellen stabil bleibt, oder im Rahmen der Kultur verloren geht¹²². Die HMECs wurden großzügigerweise von Dr. Kevin R. King, *Charles Stark Draper Laboratory, Inc., Cambridge MA, USA* zur Verfügung gestellt.

Die HMECs werden in einem Kulturmedium aus DMEM, versetzt mit 10% FBS (beide Gibco, Invitrogen Corp, Carlsbad CA, USA), 10 % GPS und 1 µg/ml Hydrocortisonacetat (beide Sigma, St Louis MO, USA) kultiviert. Die Zellen werden alle 72 bis 96 Stunden mit einer durchschnittlichen Subkultivierungsrate von 1:2 unter Verwendung von 0,05 % Trypsin (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) passagiert. Das Kulturmedium wird täglich gewechselt.

Die Zellkultur und die Morphologie der verwendeten Zellen wird regelmäßig mit einem Inversionsmikroskop (Leica DMIRB) beurteilt und die Proliferationsrate mit einem Neubauer Hämozytometer (Bright-line, Hausser Scientific, Horsham PA, USA) bestimmt. Im Rahmen der Zellzählungen wird auch eine *in vitro* Vitalitätstestung mit 0,4 % Trypanblau (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) vorgenommen.

2.2.2 Kryokonservierung

In regelmäßigen Abständen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Zellen niedriger Passagen eingefroren und mittels Kryokonservierung gelagert. Hierfür werden präkonfluente Zelllagen mit PBS gespült und mittels Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach der Zellzählung werden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 ml Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das Kulturmedium wird für die Kryokonservierung mit 5 % Dimethylsulfoxid (im Folgenden DMSO) (Sigma, St. Louis MO, USA) versetzt. Durch Verwendung spezieller Gefriercontainer (Nalge Nunc Int., Rochester NY, USA) kann beim Gefriervorgang eine schrittweise Abkühlung von 1 °C/min auf bis zu -80 °C erreicht werden. Bis zur weiteren Verwendung der Zellen werden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

Das Auftauen der Zellkulturen erfolgt über 2 Minuten im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellsuspension wird zügig in T25 Kulturflaschen mit frischem Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wird das Medium erstmalig gewechselt. Die beschriebene Kryokonservierung von Zellen ist ein etabliertes Verfahren bei der Zellkultur von Endothelzellen und vielen anderen Zellarten. Bei der Zellkultur von MLE-12 Zellen liegen hingegen bislang nur wenige Erfahrungen vor. Zur Überprüfung einer möglichen Beeinträchtigung des Proliferationsverhaltens der MLE-12 Zellen durch die Kryokonservierung werden nach dem Auftauen wiederholt ($n = 3$) jeweils $0,7 \times 10^6$ Zellen und die Zellzahl täglich mit einem Neubauer Hämocytometer bestimmt. Als Kontrolle wird eine Zellkultur ohne erfolgter Kryokonservierung mitgeführt. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.1 zusammengefasst.

2.2.3 Grün fluoreszierendes Protein

Um eine mikroskopische Bewertung der Zellproliferation in den Polymerkonstrukten zu ermöglichen werden die verwendeten Zellen (MLE-12 und HMECs) vor den Experimenten mit einem grün fluoreszierenden Protein (im Folgenden GFP) markiert. Dies erfolgt mittels eines retroviralen Vektors (murines Stammzell-Leukämie-Virus – vesiculäres Stomatitisvirus Pseudotypus G [MSCV-VSV-G-GFP]). Hierbei wird die DNS, die für das GFP kodiert, durch retrovirale Transfektion in die Wirtszellen eingebracht. Sie wird in die DNS der Wirtszelle integriert und bei den folgenden Zellteilungen repliziert. Dies bewirkt die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins durch die Zielzelle, was in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wird die Transfektion dreimal in Folge durchgeführt. Die Zellen werden hierbei in einer logarithmischen Wachstumsphase (präkonfluentes Monolayer) für jeweils 4 Stunden mit einer das Virus enthaltenden Mediumsuspension und Polybrene (Sigma, St. Louis MO, USA) in einer Konzentration von 8 µg/ml überschichtet. Das Virus für die Transfektion der MLE-12 Zellen wurde nach einem Protokoll von Seneoka et al. in SV-40 transformierten NIH/3T3 Zellen (CRL-1658, ATCC, Manassas VA, USA) hergestellt¹²³. Die dafür benötigten Plasmide wurden großzügigerweise von Dr. David Scadden, *AIDS Research Center and MGH Cancer Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School* zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung einer möglichen Beeinträchtigung des Proliferationsverhaltens der MLE-12 Zellen durch die Transfektion werden wiederholt (n = 3) jeweils $0,7 \times 10^6$ Zellen in Kulturgefäße ausgesät und die Zellzahl täglich mit einem Neubauer Hämocytometer

bestimmt. Als Kontrolle wird eine Zellkultur von MLE-12 Zellen ohne Transfektion mitgeführt. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.1 zusammengefasst.

2.3 Polymerversuche

Zur Evaluation der Wachstums- und Adhäsionseigenschaften der MLE-12 Zellen auf den verwendeten Polymeren erfolgt eine Serie von Vorversuchen. Dabei werden Polymerproben aus PC, PDMS und aufgerautem PDMS (im Folgenden rPDMS) untersucht. Als Positivkontrolle dient *polystyrene* (im Folgenden PS), ein synthetisches Material, das zur Herstellung der üblichen Zellkulturgefäße verwendet wird. Die Oberfläche des rPDMS ist mit kleinen, säulenförmigen Erhebungen besetzt (Höhe 10 µm, Durchmesser 10 µm). Diese Oberflächenbearbeitung erfolgt mittels Softlithographie und *DRIE* (siehe Kapitel 2.1.1.1) und soll eine bessere Zellhaftung bewirken. Die Polymerproben aus rPDMS wurden freundlicherweise von Dr. Michael Shin, *Laboratory of Tissue Engineering and Organ Fabrication, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School* zur Verfügung gestellt. Für die Polymerversuche werden MLE-12 Zellen auf die Polymerproben besiedelt und die Zellproliferation bzw. die Zellvitalität nach 7 Tagen untersucht. Zunächst werden hierfür 1 cm² große Polymerproben (jeweils 3 Polymerproben je Polymer) bei 25 °C mit Ethylenoxid (EO) sterilisiert und in jeweils einer 4 cm Petrischale ausgelegt. Die Besiedelung der Polymerproben erfolgt mittels 5 ml einer Zellsuspension mit $0,1 \times 10^6$ /ml MLE-12 Zellen.

Um die Materialeigenschaften der verwendeten Polymere im Hinblick auf Zellkultur zu optimieren, wird in einer 2. Versuchsserie die Beschichtung der Polymeroberfläche mit unterschiedlichen Proteinen der EZM untersucht. Dafür werden wiederum 1 cm² große Polymerproben nach Sterilisation mit Kollagen I (Cohesion, Palo Alto CA, USA),

Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (alle Sigma, St. Louis MO, USA) beschichtet (jeweils 3 Polymerproben je Polymer und Beschichtung). Dabei wird Kollagen I in einer Konzentration von 30 µg/ml und 15 µg/ml, Kollagen IV in einer Konzentration von 18 µg/ml, Laminin in einer Konzentration von 10 µg/ml und Fibronectin in einer Konzentration von 7,5 µg/ml verwendet. Untersucht werden erneut Polymerproben aus PC, PDMS und rPDMS. Als Positivkontrolle dient wiederum PS. Die Polymerproben werden für 24 Stunden in der entsprechenden Lösung inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Als Negativkontrolle dienen die Polymerproben ohne spezielle Oberflächenbeschichtung. Die Besiedelung der beschichteten Polymerproben erfolgt analog der oben beschriebenen Serie in Petrischalen mit jeweils 5 ml einer Zellsuspension mit $0,1 \times 10^6$ /ml MLE-12 Zellen.

Das Kulturmedium wird täglich gewechselt. Täglich wird die Proliferation der MLE-12 Zellen mikroskopisch beurteilt. Nach 7 Tagen werden die Polymerproben aus den Petrischalen entnommen und mittels Vitalitätstest (Molecular Probes, Eugene OR, USA) (siehe Kap. 2.7.2) und Zellzählungen mit einem Neubauer Hämocytometer beurteilt.

2.4 Versuchsanordnung

Nach der Sterilisierung der Polymerkonstrukte wird entsprechend der Ergebnisse der Polymerversuche (siehe Kap. 3.3) eine Beschichtung der Polymeroberflächen mit Laminin vorgenommen. Hierfür werden beide Kompartimente für 24 Stunden mit 70 % Ethanol vorbehandelt. Auf diese Weise können die hydrophilen Eigenschaften der Polymere verstärkt und kleine Luftblasen aus den Kanälen des Gefäßnetzwerkes herausgelöst werden. Im Anschluss werden die Kompartimente mit 10 µg/ml Laminin

befüllt und die Polymerkonstrukte für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Beschichtung werden die Zweikammersysteme im Inkubator mit dem Perfusionssystem verbunden. Dabei wird zunächst eine 60 ml Perfusorspritze an die Zuleitung der Gefäßversorgung angeschlossen. In die Zuleitung wird zwischen Perfusor und Polymerkonstrukt ein Oxygenator installiert. In mehreren Schlingen kann darin das Kulturmedium durch die Wand der Zuleitung mit Sauerstoff angereichert werden. Anschließend wird die Ableitung mit einem Reservoir verbunden, in dem das Kulturmedium nach Perfusion des Polymerkonstruktes aufgefangen wird. Durch Abdichten der *Luer* Konnektoren mit Parafilm soll ein Eindringen von Gasblasen in das Polymerkonstrukt verhindert werden. Bis zur Besiedelung der parenchymalen Kompartimente werden die Vorrichtungen mit einem kontinuierlichen Fluss von 0,5 ml/h Kulturmedium perfundiert. Hierfür wird mit einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston MA, USA) verwendet.

Abb. 11

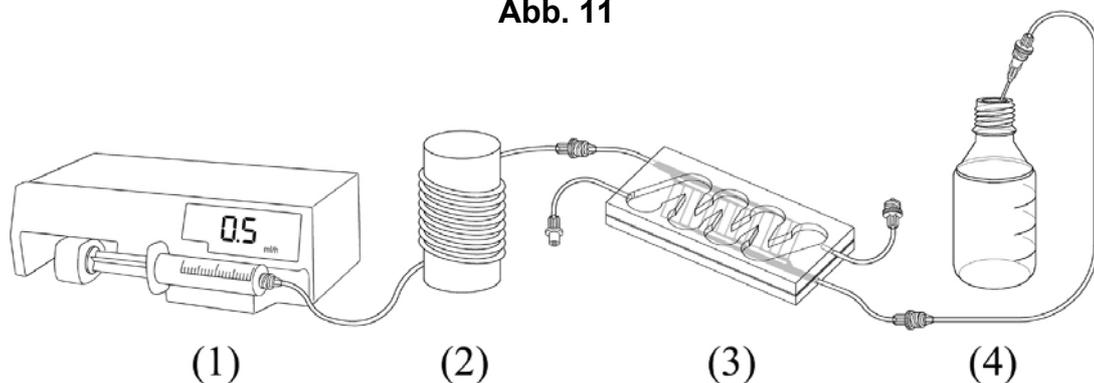


Abbildung 11 – Versuchsaufbau

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus aus Spritzenpumpe (1), Oxygenator (2), Polymerkonstrukt mit integriertem Gefäßsystem (3) und Reservoir (4).

2.5 Besiedelung

Bei mehreren Versuchsserien in Vorbereitung für diese Arbeit kommt es nach der Besiedelung der Polymerkonstrukte mittels Einzelzellsuspension wiederholt zum vollständigen Verlust der besiedelten Zellen. Ursächlich hierfür ist vermutlich, dass die Zellen nach der Besiedelung nur unzureichend auf dem Polymer anwachsen und konsekutiv untergehen. Das Anwachsen der Zellen auf der Zellkulturfläche nach der Besiedelung ist ein empfindlicher Prozess, der bei adhärent wachsenden Zellen Voraussetzung für die Proliferation der Zellen ist.

Mit der Verwendung von Mikroträger für die Besiedelung der Polymerkonstrukte wird in der vorliegenden Arbeit eine neue Besiedelungsmethode für geschlossene Kultursysteme vorgestellt. Durch den Transfer fest adhärenter und organisierter Zellpopulationen kann diese kritische Phase des TE verbessert werden. Zudem können mit der Besiedelungsmethode die potentiell schädigenden Einflüsse von Trypsin auf die Zellen minimiert werden.

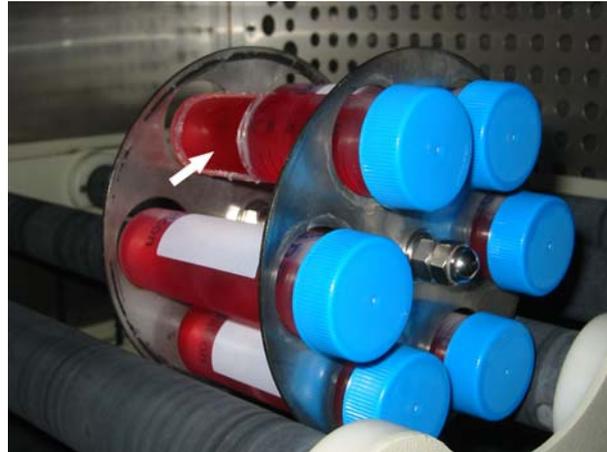
2.5.1 Mikroträger

Mikroträger werden in der Zellkultur für so genannte Massenkulturen verwendet. Sie sind je nach Verwendungszweck in Größen von wenigen Mikrometern bis zu Millimetern und aus verschiedenen Materialien mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten und physikalischen bzw. chemischen Eigenschaften verfügbar.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroträger (Biosilon, Nalge Nunc Int., Rochester NY, USA) handelt es sich um kleine kugelige Strukturen aus PS. Biosilon Mikroträger haben eine Dichte von $1,05 \text{ g/cm}^3$ und Durchmesser von $150 \text{ }\mu\text{m}$ bis $300 \text{ }\mu\text{m}$. Um für

die Arbeit Mikroträger gleicher Größe zu erhalten, werden sie mehrfach mechanisch gesiebt. Hierbei werden US Standard Siebe #60, #70, und #80 (Newark wire cloth company, Newark NJ, USA) mit einer Maschenweiten von 180 μm , 212 μm und 250 μm verwendet. Die Größentrennung wird mittels Lichtmikroskopie und MetaMorph Software überprüft und ist in Kapitel 3.4 dargestellt. In den Experimenten werden Mikroträger mit einem Durchmesser von durchschnittlich $272,2 \mu\text{m} \pm 13,5 \mu\text{m}$ verwendet.

Zum Aufbringen der MLE-12 Zellen auf die Mikroträger werden 5×10^6 Zellen mit 1×10^4 Mikroträgern in 15 ml Zellkulturmedium in T75 Zellkulturflaschen gegeben und im Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden ist die Oberfläche der Mikroträger auf dem Grund der Kulturflasche mit einem lockeren Zellrasen bedeckt. Die Zelldichte auf den Mikrosphären lässt sich dabei aufgrund der zum Durchmesser der Mikroträger vergleichsweise geringen Tiefenschärfe des Inversionsmikroskops allerdings nur visuell abschätzen. Durch Spülen mit frischem Zellkulturmedium können die Mikroträger vom Grund der Kulturflasche abgelöst werden. Anschließend erfolgt eine dynamische Kultur, um ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen auf der Oberfläche der Mikroträger zu erreichen. Hierfür werden analog zur Arbeit von Terai et al. spezielle Kulturflaschen mit einer Silikon-Fensterung für ausreichende Sauerstoffversorgung und ein modifiziertes Rollersystem verwendet ¹²⁴ (siehe Abbildung 12).

Abb. 12**Abbildung 12 – Dynamische Zellkultur**

Modifiziertes Rollersystem für Kulturgefäßen mit Silikon-Fensterung (Pfeil) im Inkubator.

Die Mikroträger werden hierfür in 40 ml Kulturmedium resuspendiert und in den Kulturflaschen für 48 Stunden bei 6 U/min inkubiert. Nach der dynamischen Kultur zeigt sich auf der Oberfläche der Mikroträger ein homogener Zellrasen in der Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 13a, b).

Jeweils 1000 der beladenen Mikroträger werden in 300 µl frischem Kulturmedium aufgenommen und mittels einer sterilen 1 ml Spritze über die Zuleitung in die parenchymalen Kammer der Polymerkonstrukte injiziert. Durch vorsichtiges Spülen der zu- und abführenden Schlauchverbindungen kann beim Transfer ein Verstopfen durch Mikroträger verhindert werden.

Abb. 13a

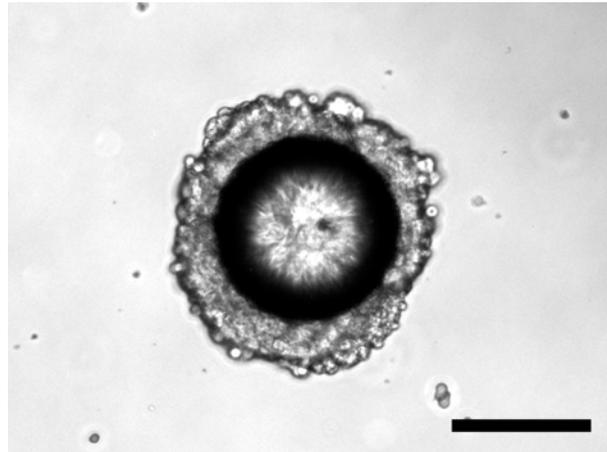


Abbildung 13a – Beladener Mikroträger, Phasenkontrast

MLE-12 Zellen auf der Oberfläche eines Mikroträgers in der Phasenkontrastmikroskopie.
Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

Abb. 13b

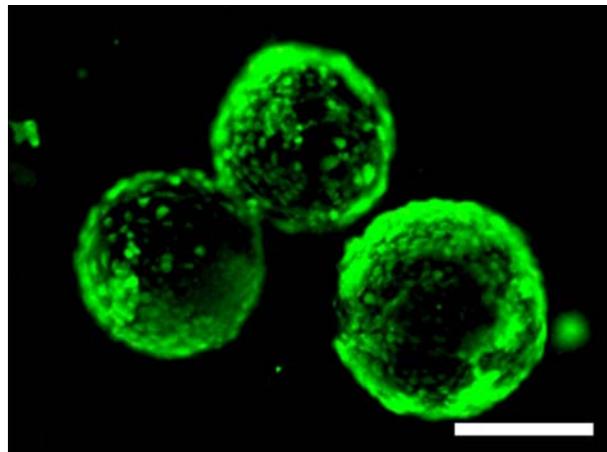


Abbildung 13b – Beladene Mikroträger, Fluoreszenzmikroskopie

MLE-12 Zellen auf der Oberfläche eines Mikroträgers in der Fluoreszenzmikroskopie.
Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

2.6 Konditionierung

Während der Konditionierung der Polymerkonstrukte wird das vaskuläre Kompartiment mittels einer Spritzenpumpe 7 Tage kontinuierlich mit 0,5 ml/h Kulturmedium perfundiert. Dabei wird ständig frisches Kulturmedium zugeführt (offenes Perfusionssystem). Bei dieser *single flow* Technik wird im Gegensatz zu einem geschlossenen Kreislauf das Kulturmedium den Zellen nur einmal zugeleitet. So wird über den gesamten Zeitraum ein konstanter Gehalt an Nährstoffen im Kulturmedium gewährleistet und die Anhäufung von Stoffwechselmetaboliten im Zulauf vermieden.

2.7 Evaluierung

Die Evaluierung der Polymerkonstrukte umfasst morphometrische Bildanalysen und DNS Messungen zur Quantifizierung der Proliferation, Vitalitätstests, funktionelle Untersuchungen mittels immunhistochemischer Färbung auf Surfactant assoziierte Proteine und Rasterelektronenmikroskopie (im Folgenden REM) nach 7 Tagen.

Während des Versuchszeitraums werden die Polymerkonstrukte im Abstand von 24 Stunden dem Inkubator entnommen und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Aufrechtmikroskop: eclipse TE 600 und Inversionsmikroskop: eclipse TE 2000U, Nikon, Japan) untersucht. Dabei werden die einzelnen Vorrichtungen an Zu- und Ableitung abgeklemmt und diskonnektiert. Mit Hilfe optischer Filter für GFP (488 nm) kann ein visueller Eindruck über den Proliferationszustand der MLE-12 Zellen innerhalb der parenchymalen Kammer gewonnen werden. Mit einer digitalen Kamera (cool snap HQ, Nikon, Japan) werden Aufnahmen vom Inneren der Polymerkonstrukte in 40facher und 100facher Vergrößerung angefertigt und ausgewertet.

2.7.1 DNS Messung

Zur Beurteilung der Zellproliferation durch exakten Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Polymerkonstrukte während der Konditionierungsphase wird die Menge der zellulären DNS mit dem DNeasy Gewebe-Kit (Quiagen Inc., Valencia CA, USA) gemessen. Der Aufschluss der Zellen erfolgt dabei mit Proteinase K. Hierzu werden die Polymerkonstrukte nach Abschluss der Konditionierung mit 20 mg/ml Proteinase K infiltriert und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Das Lysat wird auf die DNeasy Säule gegeben. Die Extraktion der DNS erfolgt dabei durch spezifische Bindung der Nukleinsäuren an die Silica-Gel-Membran der DNeasy Säule. Nach mehreren Waschschritten kann die bereinigte DNS aus der Säule herausgewaschen und mittels eines Spektrophotometers (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) gemessen werden. Dabei wird die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) für die Probe jeweils als Dreifachmessungen bestimmt und die DNS Konzentration errechnet. Als Ausgangswert wird der DNS Gehalt in der Suspension aus beladenen Mikroträgern zum Zeitpunkt der Besiedelung bestimmt. Hierbei erfolgt die Lyse und DNS Isolierung wie für die Polymerkonstrukte beschrieben.

Der Quotient A_{260}/A_{280} dient als Indikator für die Reinheit der untersuchten Probe. Er beträgt laut Herstellerangaben bei bereinigten DNS Proben zwischen 1,7 und 1,9. Mittels A_{260} kann die DNS Konzentration unter Einbeziehung der jeweils verwendeten Verdünnung berechnet werden (Formel 1). Die Zellzahl der einzelnen Proben wird über eine Standardkurve ermittelt ¹²⁵.

Formel 1: $[\text{DNS Konzentration}] = 50 \mu\text{g/ml} \times [A_{260}] \times [\text{Verdünnungsfaktor}]$

2.7.2 Vitalitätstest

Die Vitalitätsbestimmung erfolgt mittels des *Live/Dead assay* (Molecular Probes, Eugene OR, USA). Der Test besteht aus 4 mM Calcein AM und 2 mM Ethidium Homodimer 1 und ermöglicht eine spezifische Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen. Die Methode beruht auf der Aktivität ubiquitär vorkommender zytoplasmatischer Esterasen, welche die enzymatische Konversion des polyanionischen Calcein AM in einen intensiven grün fluoreszierenden Farbstoff in vitalen Zellen bewirken. Eine Penetration des großen Molekül Ethidium in das Zellinnere vitaler Zellen wird durch eine intakte Zellmembran verhindert. Durch beschädigte Zellmembranen von avitalen Zellen kann das Ethidium hingegen in das Zellinnere gelangen, was eine Komplexbildung von Ethidium mit Bestandteilen der zellulären Nukleinsäuren ermöglicht. Dies bewirkt eine intensive rote Fluoreszenz avitaler Zellen. Beide Komponenten des Assay sind farblos und fluoreszieren erst nach Interaktion mit den genannten Zellbestandteilen¹²⁶.

Für die Vitalitätstestung der Zellen in den parenchymalen Kompartimenten werden die Polymerkonstrukte nach der Konditionierungsphase von 7 Tagen mit PBS gespült. Anschließend werden die parenchymalen Kammern mit der Testlösung gefüllt und für 5 Minuten bei Raumluft inkubiert. Durch erneutes Spülen mit PBS wird die Farbreaktion gestoppt. Unter dem Auflichtmikroskop können die angefärbten Zellen mit Grün- (488 nm) und Rotfilter (594 nm) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der Ergebnisse des Vitalitätstests erfolgt mit einer digitalen Kamera in 40facher Vergrößerung.

Die morphometrische Analyse der Bilder ermöglicht die Bestimmung der Zellvitalität für jedes einzelne Bild. Bei der morphometrischen Analyse mit MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown PA, USA) handelt es sich um ein computergestütztes

Verfahren zur Bestimmung der geometrischen Fläche eines Farbtons in Abhängigkeit von seiner Intensität auf digitalen Abbildungen.

2.7.3 Funktionelle Untersuchung

Die Funktionelle Untersuchung der Zellen innerhalb der parenchymalen Kompartimente erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung auf die Surfactant assoziierten Proteine B (SP-B) und C (SP-C). Bei SP-B and SP-C handelt es sich um kleine Proteolipide, die durch Proteolyse aus einem großen Vorstufenprotein abgespalten werden (proSP-B und proSP-C). Für die Färbungen werden Untersuchungsproben der konditionierten Polymerkonstrukte entnommen und wiederholt mit PBS gespült. Hierfür werden die Zweikammersysteme nach der Konditionierung vorsichtig mit einem Skalpell entlang des parenchymalen Kompartiments eröffnet und aus der freigelegten PC-Membran kleine Proben herausgelöst. Diese werden über 15 Minuten in 4 % Paraformaldehyd (Sigma, St Louis MO, USA) fixiert. Im Anschluss erfolgt eine Serumblockade mit 6 % BSA (Sigma, St Louis MO, USA) und 10 % Ziegen Serum (Sigma, St Louis MO, USA) für 1 Stunde. Als primäre Antikörper werden anti-proSP-B und anti-proSP-C Antikörper (Chemicon, Temecula CA, USA) verwendet. Bei den Antikörpern handelt es sich um im Kaninchen hergestellte polyklonale Antikörper, die sowohl gegen das N- als auch gegen das C-Peptid des murinen proSP-B bzw. proSP-C gerichtet sind. Die Untersuchungsproben werden über 12 Stunden mit den Antikörpern in einer Verdünnung von 1:500 bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundärer Antikörper wird ein anti-Kaninchen IgG (Sigma, St Louis MO, USA) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Dabei handelt es sich um einen biotinylierten monoklonalen Ziegenantikörper gegen kaninchenspezifische Antigene. Nach einer Inkubation von 2

Stunden wird Streptavidin (Molecular Probes, Eugene OR, USA) in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Proteintetramer, das Biotin mit einer hohen Bindungskonstante bindet. Durch die Konjugation eines fluoreszierenden Farbstoffes (Alexa Fluor 594) an das Streptavidin lassen sich biotinylierten Strukturen mit einer hohen Sensitivität darstellen. Für die genaue Lokalisation der Proteine wird eine Kernfärbung mit Diamidinophenylindiol-dihydrochlorid (im Folgenden DAPI) in einer Konzentration von 10 µg/ml vorgenommen.

Bei Negativkontrollen wird anstelle der primären Antikörper PBS in gleicher Menge verwendet.

2.7.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM Untersuchungen werden mit einem JSM-5910 Rasterelektronenmikroskop (JEOL, Peabody MA, USA) am *Center for Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology (MIT)* vorgenommen. Die Entnahme der Untersuchungsproben erfolgt dabei analog der Entnahme für die immunhistochemischen Färbungen. Die Proben werden für 24 Stunden in 10 % Formalin (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, USA) fixiert und daraufhin in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 %) für jeweils 10 Minuten entwässert. Im Anschluss werden die Proben für 15 Minuten mit 98 % Hexamethyldisilazane (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, USA) behandelt und dann für 24 Stunden in einem Vakuumcontainer getrocknet. Für Untersuchungen einer Bruchkante der Konstrukte werden Polymerproben 1 Minute in flüssigen Stickstoff getunkt und vorsichtig mit einer Pinzette gebrochen. Die Proben werden auf einem Stiftprobenhalter für REM angeordnet und zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit mit einer 100

Ä dünne Schicht Gold-Palladium bedampft. Die REM erfolgt bei einer Beschleunigungsspannung von 5 KV und einer Aperturblende von 30 µm. Bilder werden in 150facher bis 9000facher Vergrößerung angefertigt und digital im TIF-Format gespeichert.

2.8 Endothelialisierung der Gefäßsysteme

In den ergänzenden Experimenten der vorliegenden Arbeit soll eine Auskleidung der Gefäßsysteme innerhalb des Polymers mit HMECs erfolgen. Zur Charakterisierung der HMECs dient eine immunhistochemische Färbung der Zellen mit CD31. Hierfür werden HMECs in einer Konzentration von $0,5 - 1 \times 10^6$ /ml Zellen auf Polymerproben aus PDMS ausgesät. Nachdem die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben (nach 24 bis 48 Stunden) werden die Polymerproben wiederholt mit PBS gespült. Im Anschluss erfolgt eine Fixierung der Proben mit 4 % Paraformaldehyd über 15 Minuten. Eine Serumblockade wird mit 6 % BSA und 10 % Ziegen Serum (alle Sigma, St Louis MO, USA) für 1 Stunde durchgeführt. Als primäre Antikörper werden anti-CD31 Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Bei dem Antikörper handelt es sich um einen in der Maus hergestellten monoklonalen Antikörper, der gegen humanes CD31 gerichtet ist. Die Untersuchungsproben werden über 12 Stunden mit den Antikörpern in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Als sekundärer Antikörper wird ein anti-Maus IgG (Molecular Probes, Eugene OR, USA) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Ziegenantikörper gegen mausspezifische Antigene, der direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Alexa Fluor 488) konjugiert ist. Für die genaue Lokalisation der angefärbten Antigene erfolgt analog

der immunhistochemischen Färbung der MLE-12 Zellen eine Kernfärbung mit DAPI in einer Konzentration von 10 µg/ml (siehe Kap. 2.7.3).

Für die Endothelialisierung der Gefäßsysteme der vaskulären Kompartimente erfolgt eine Vorbehandlung der Polymerkonstrukte wie vor der Besiedelung der parenchymalen Kompartimente mit Laminin (siehe Kap. 2.4). Für die Besiedelung der kapillären Gefäßsysteme wurden die HMECs in einer Einzelzellsuspension von $1 - 2 \times 10^6$ /ml Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird über den Zulauf in das kapilläre Gefäßsystem der Polymerkonstrukte injiziert. Der Überschuss der zur Besiedelung verwendeten Suspension wird nach Austritt aus dem Ablauf des Gefäßsystems verworfen. Nach statischer Inkubation über 6 Stunden im Inkubator werden die Zweikammersysteme an das Perfusionssystem angeschlossen und jeweils über das vaskuläre Kompartiment kontinuierlich mit 0,5 ml/h Kulturmedium perfundiert (siehe Kap. 2.4). Während des Versuchszeitraums werden die Polymerkonstrukte im Abstand von 24 Stunden dem Inkubator entnommen und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (siehe Kap. 2.7).

Nach Konditionierung der HMECs in den kapillären Gefäßsystemen über 7 Tagen ist die Evaluation der Polymerkonstrukte mittels Vitalitätsbestimmung und immunhistochemischer Färbung vorgesehen.

2.9 Statistik und Illustration

Die statistische Auswertung und graphische Aufarbeitung der erhobenen Daten werden mittels Sigma Plot für Windows, Version 9.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) und SPSS für Windows, Version 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Die schematischen Abbildungen werden mit Adobe Photoshop für Windows, Version 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) erstellt.