

3 Ergebnisse

3.1 Polymerkonstrukte

Durch die Softlithographie, einer Technologie aus dem Gebiet der Mikrosystemtechnik, ist es möglich, feine Kanalstrukturen in hoher Detailauflösung in PDMS zu übertragen und so ein Gefäßsystem in das Polymerkonstrukt zu integrieren. Abbildung 14 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Kanalsystems in PDMS. Die Kanäle haben eine Weite von 30 μm bis 2 mm (letzteres nicht abgebildet) und eine einheitliche Tiefe von 100 μm .

Abb. 14

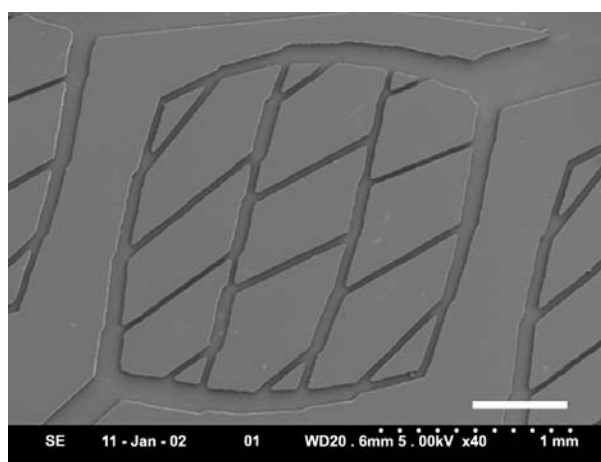


Abbildung 14 – Gefäßsystem (REM)

Gefäßsystem in PDMS (Ausschnitt). Das Design wurde mit einem Computermodell entwickelt und durch Softlithographie in das Polymer übertragen. (Maßbalken 500 μm)
Mit freundlicher Genehmigung von Kevin R. King, Draper Laboratory, Cambridge MA, USA

Nach der Verbindung der einzelnen Teile der Polymerkonstrukte kann die Durchgängigkeit des integrierten Gefäßsystems durch die Perfusion mit Fluoreszein geprüft werden (siehe Abbildung 15).

Abb. 15



Abbildung 15 – Gefäßsystem (Fluoreszenzmikroskopie)

Durchgängigkeit des Gefäßsystems in PDMS bei der Perfusion mit Fluoreszein. Vergrößerung 20x, Ausschnitt (Maßbalken 500 μm).
Mit freundlicher Genehmigung von Kevin R. King, Draper Laboratory, Cambridge MA, USA

Durch Berechnungen mittels des Computeralgorithmus lassen sich die Flusseigenschaften innerhalb des Gefäßsystems genau charakterisieren. Bei einem Gesamtfluss von 0,5 ml/h Blut (Hämatokrit 45 %) durch das vaskuläre Kompartiment verteilt sich der Fluss an den Aufzweigungen der einzelnen Kanäle gleichmäßig auf die Folgegenerationen der Kanäle. In den feinsten Kapillaren wird ein Fluss von 0,082 ml/h erreicht. In Abhängigkeit vom Fluss in den einzelnen Gefäßabschnitten verändern sich auch Druck und die damit verbundene Wandspannung. Die Abbildungen 16a - c zeigen die Parameter in den einzelnen Segmenten des Gefäßsystems.

Abb. 16a

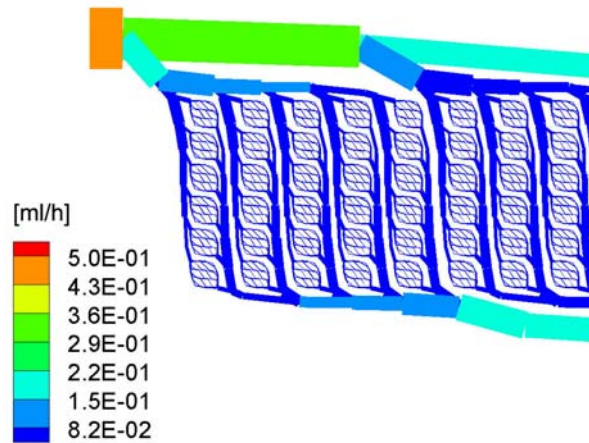


Abbildung 16a – Fluss [ml/h]

Flussverteilung bei einer simulierten Perfusion des vaskulären Kompartimentes mit 0,5 ml/h Blut.

Mit freundlicher Genehmigung von Mohammad R. Kaazempur-Mofrad,
Dept. of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technologies, Cambridge MA, USA

Abb. 16b

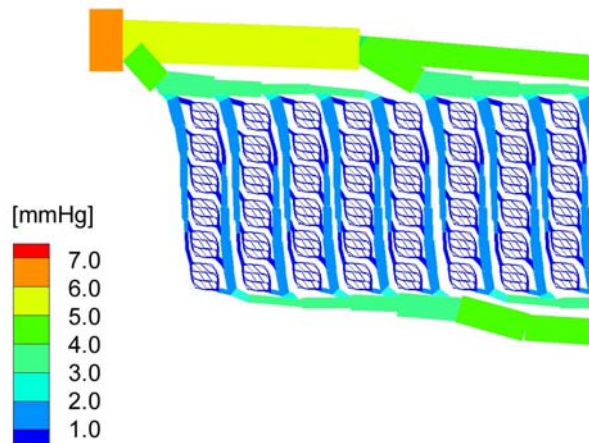
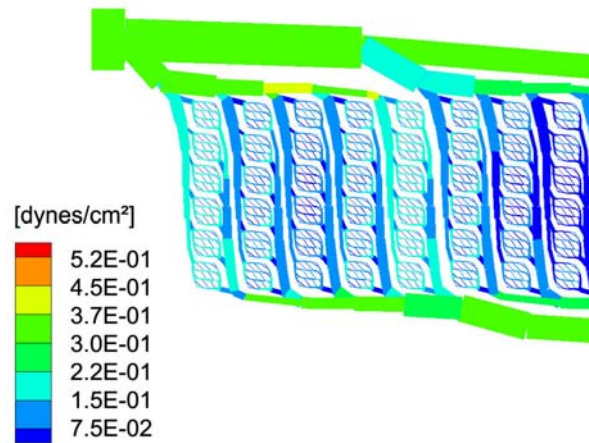


Abbildung 16b – Druck [mmHg]

Druckverteilung bei einer simulierten Perfusion des vaskulären Kompartimentes mit 0,5 ml/h Blut.

Mit freundlicher Genehmigung von Mohammad R. Kaazempur-Mofrad,
Dept. of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technologies, Cambridge MA, USA

Abb. 16c

**Abbildung 16c – Scherspannung [dynes/cm²]**

Scherspannung in den einzelnen Segmenten bei einer simulierten Perfusion des vaskulären Kompartiments mit 0,5 ml/h Blut.

Mit freundlicher Genehmigung von Mohammad R. Kaazempur-Mofrad,
Dept. of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technologies, Cambridge MA, USA

3.2 Zellkultur

3.2.1 MLE-12

Um einen möglichen Einfluss der Kryokonservierung auf das Proliferationsverhalten der verwendeten MLE-12 Zellen zu untersuchen werden wiederholt jeweils $0,7 \times 10^6$ frisch aufgetaute Zellen und Zellen, die noch nicht eingefroren waren, in Kulturgefäße ausgesät und täglich mit einem Neubauer Hämocytometer gezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

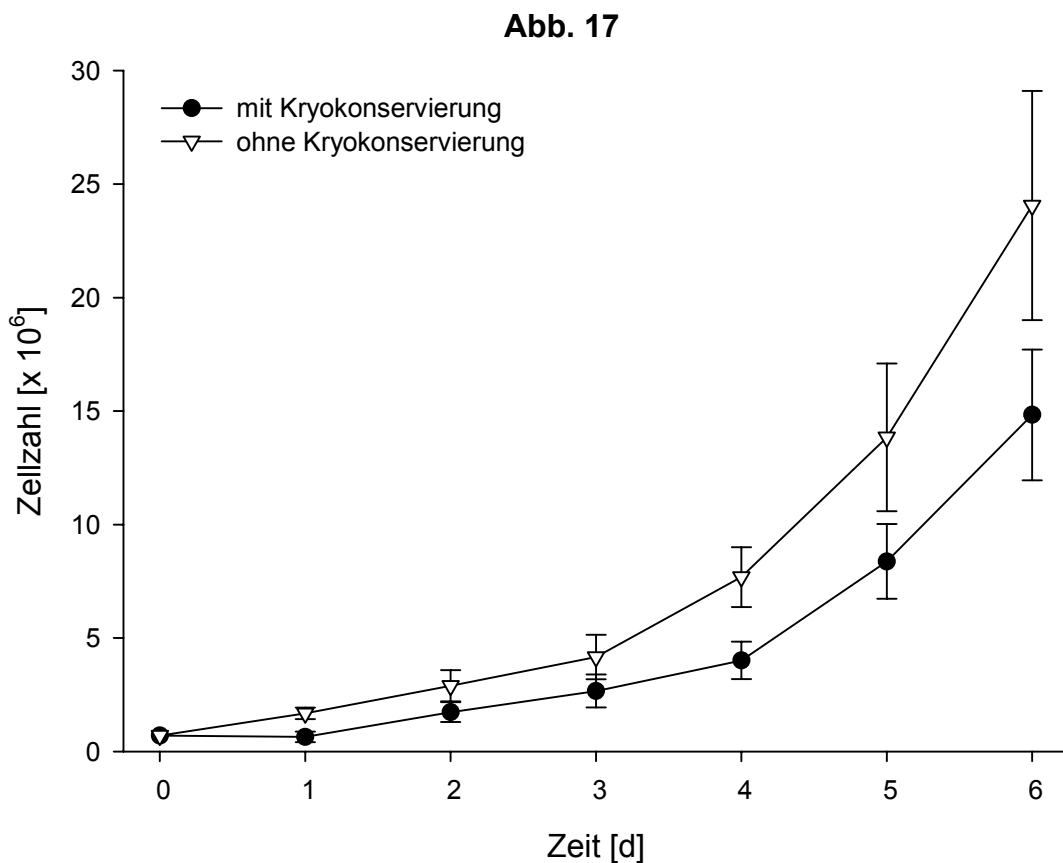


Abbildung 17 – Zellproliferation

Zellzahl der MLE-12 Zellen mit (●) und ohne Kryokonservierung (▽) für 6 Tage nach Aussaat von $0,7 \times 10^6$ Zellen ($n = 3$; Standardabweichung).

In der logarithmischen Darstellung wird deutlich, dass die Proliferation der Zellen direkt nach dem Auftauen zunächst stagniert, die Proliferationsrate nach 24 Stunden aber bereits ansteigt, und die Proliferation der Zellpopulation in ähnlicher Weise erfolgt, wie vor einer Kryokonservierung (siehe Abbildung 18).

Abb. 18

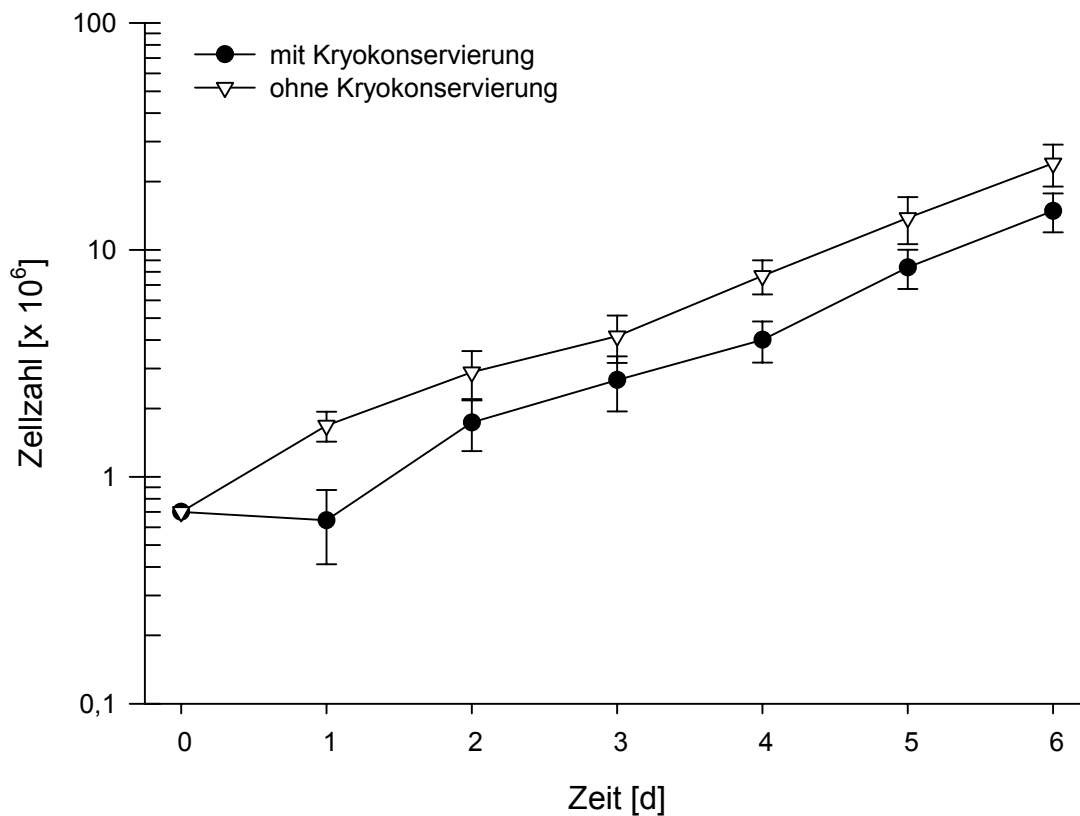


Abbildung 18 – Zellproliferation (logarithmisch)

Zellzahl der MLE-12 Zellen mit (●) und ohne Kryokonservierung (▽) für 6 Tage nach Aussaat von $0,7 \times 10^6$ Zellen mit logarithmischer Skalierung der y-Achse ($n = 3$; Standardabweichung).

Die verwendeten Zellen werden retroviral mit GFP transfiziert, um eine mikroskopische Bewertung der Zellen in den Polymerkonstrukten zu ermöglichen. Im Anschluss erfolgt eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Transfektionsergebnisses (siehe Abbildung 19).

Abb. 19

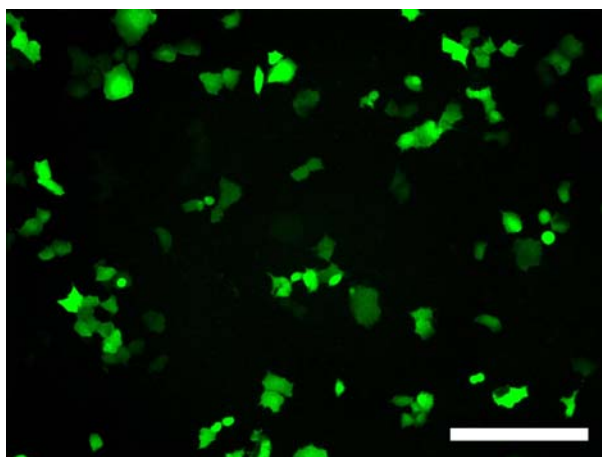
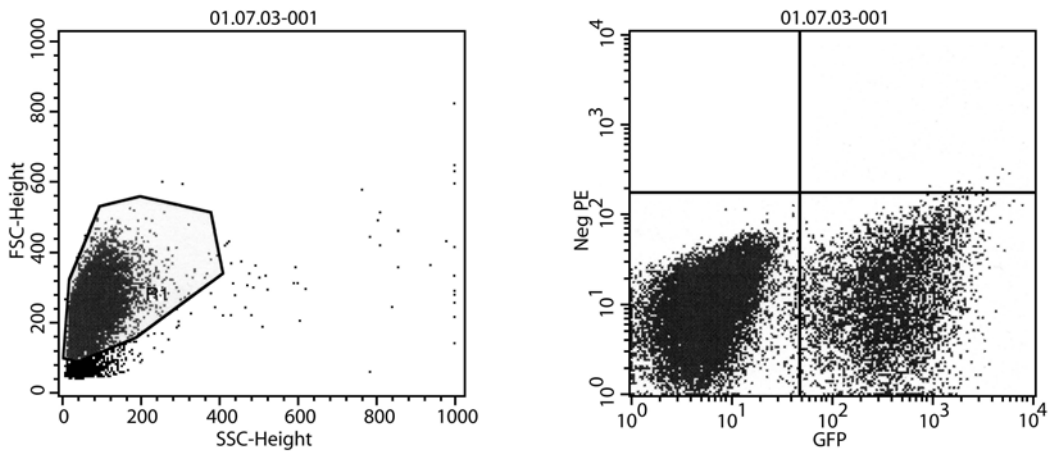


Abbildung 19 – GFP-MLE-12

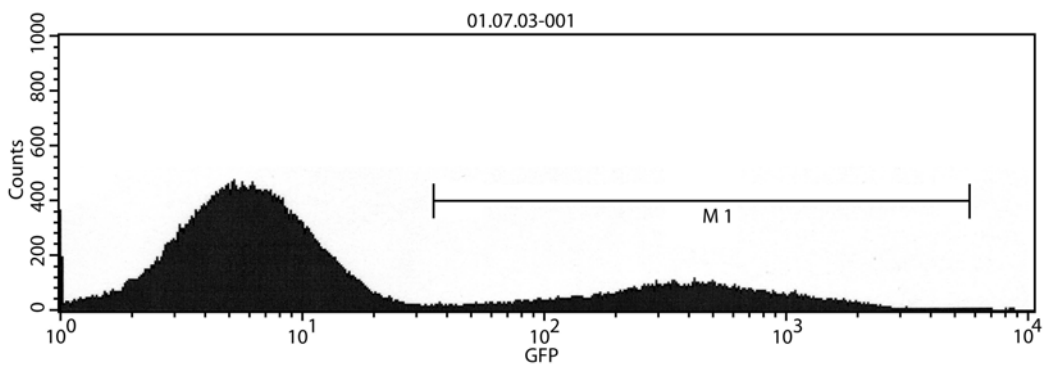
MLE-12 Zellen auf Polystyrene nach Transfektion mit GFP.
Vergrößerung 200x (Maßbalken 100 µm)

Um die Ausbeute an GFP exprimierenden Zellen in der Zellpopulation zu erhöhen, wird ein *fluorescence activated cell sorting* (im Folgenden FACS) durchgeführt. Auf diese Weise kann der Anteil der markierten Zellen auf über 70 % gesteigert werden. Dieses Verfahren wurde mit der freundlichen Hilfe von Dr. Gregor Adams, *Surgical Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School* durchgeführt.

Abb. 20



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	68	0.07	0.07	2946.11	2549.31	225.59	215.28
LL	73076	77.33	73.08	7.05	75.73	12.16	8.94
LR	21351	22.59	21.35	559.22	377.20	20.20	11.35



Mark	Left	Right	Events	% Gated	% Tot	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1,	9910	94495	100.00	94.49	133.92	14.81	273.42	7.23	5
M1	34,	5523	21900	23.18	21.90	548.63	359.43	101.79	371.80	403

Abbildung 20 – FACS Analyse

Ergebnisse des FACS. Hierbei können Zellen mit starker Fluoreszenz (M1) von der Gesamtheit der Zellen getrennt werden.

Mit freundlicher Genehmigung von Gregor Adams, Surgical Research Laboratory
Dept. of Surgery, Massachusetts General Hospital, Boston MA, USA

Das Ergebnis des FACS ist exemplarisch in Abbildung 21 dargestellt.

Abb. 21

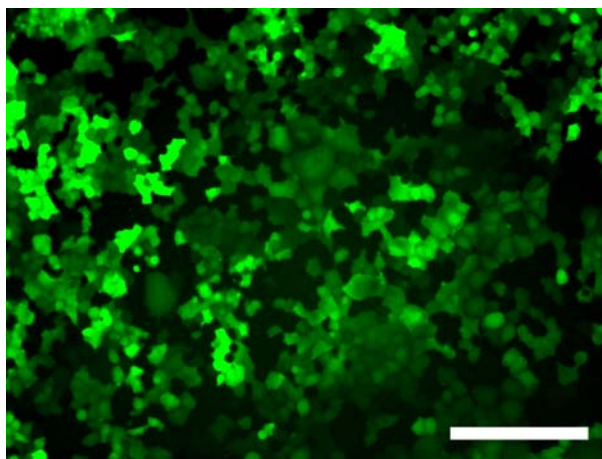


Abbildung 21 – GFP-MLE-12

MLE-12 Zellen auf *polystyrene* nach Transfektion mit GFP und FACS.
Vergrößerung 200x (Maßbalken 100 µm)

Um eine möglichen Beeinflussung der Transfektion auf das Proliferationsverhalten der MLE-12 Zellen zu untersuchen werden jeweils $0,7 \times 10^6$ Zellen mit und ohne erfolgter GFP Transfektion in Kulturgefäße ausgesät und täglich mit einem Neubauer Hämocytometer gezählt. Hierbei kann gezeigt werden, dass sich die Proliferationsrate der beiden Zellpopulationen nur geringfügig voneinander unterscheidet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 abgebildet.

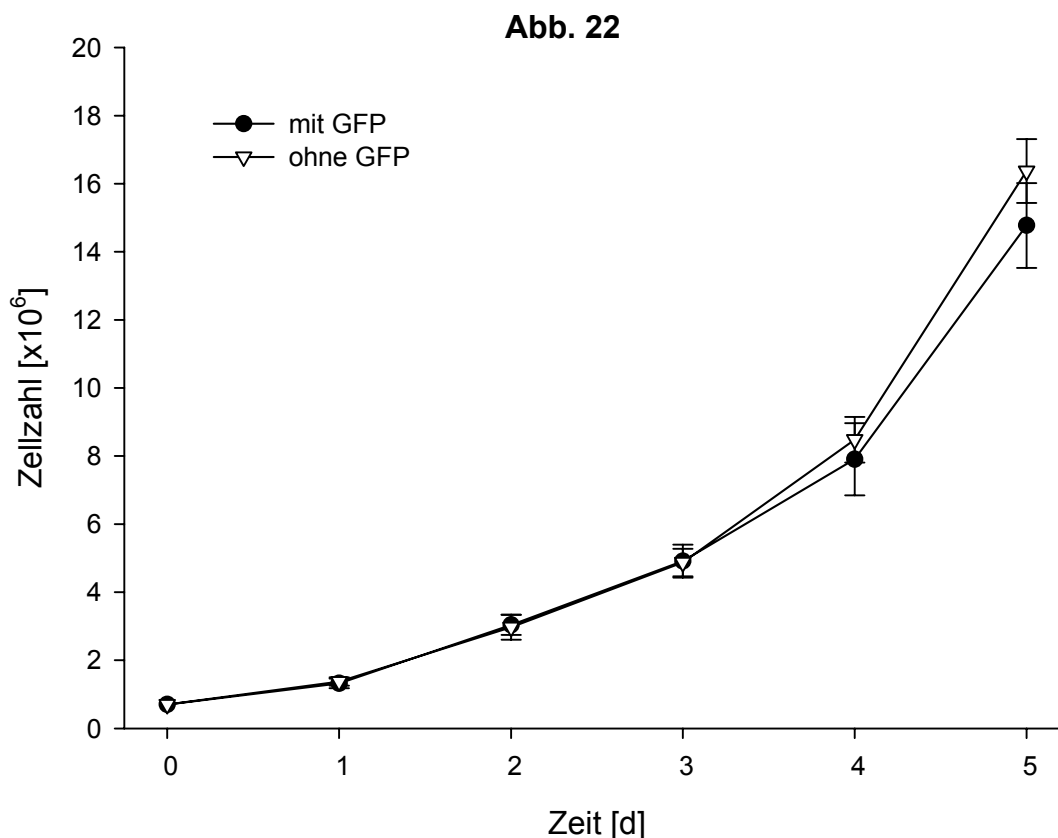


Abbildung 22 – Zellproliferation

Zellzahl der MLE-12 Zellen mit (●) und ohne GFP (▽) für 5 Tage nach Aussaat von $0,7 \times 10^6$ Zellen ($n = 3$; Standardabweichung).

Durch die Transfektion der MLE-12 Zellen kommt es zudem nicht zu einer nennenswerten Beeinträchtigung der Zellvitalität. Bei der Kultur der unterschiedlichen Zellpopulationen in Kulturflaschen kann nach 5 Tagen eine durchschnittliche Vitalität von $91,5 \pm 0,77$ % der transfizierten Zellen im Vergleich zu $91,2 \pm 0,67$ % der nicht transfizierten Zellen dokumentiert werden.

Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der MLE-12 Zellen ist zumindest über insgesamt 10 Passagen fluoreszenzmikroskopisch nicht erkennbar. Die Stabilität der GFP Expression wird im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weitergehend quantifiziert.

Tab. 1

Zeit [d]	GFP Zellzahl [$\times 10^6$]*	n-GFP Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-Test	GFP vitale Zellen [%]*	n-GFP vitale Zellen [%]*	t-Test
0	0,7	0,7	P = 1,00	100,0	100,0	P = 1,00
1	1,3 \pm 0,14	1,4 \pm 0,12	P = 0,65	92,4 \pm 0,94	92,7 \pm 0,16	P = 0,57
2	3,0 \pm 0,29	3,0 \pm 0,37	P = 0,82	91,4 \pm 0,71	92,1 \pm 0,55	P = 0,26
3	4,9 \pm 0,49	4,9 \pm 0,40	P = 0,92	90,4 \pm 2,50	91,0 \pm 0,49	P = 0,74
4	7,9 \pm 1,06	8,5 \pm 0,67	P = 0,47	92,2 \pm 0,82	92,2 \pm 1,41	P = 0,99
5	14,8 \pm 1,24	16,4 \pm 0,94	P = 0,15	91,5 \pm 0,77	91,2 \pm 0,67	P = 0,64

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

Tabelle 1 – Zellproliferation nach GFP

Zellzahl und Vitalität der Zellpopulationen vor (n-GFP) und nach (GFP) Transfektion mit GFP für 5 Tage (3 Passagen) nach Aussaat von $0,7 \times 10^6$ vitalen Zellen (n = 3).

3.2.2 HMECs

Um eine Auskleidung des Gefäßsystems innerhalb des Polymers mit einem Endothel zu erreichen werden HMECs in die Kapillaren besiedelt und mittels Perfusion von Kulturmedium konditioniert. Zur Charakterisierung der HMECs dient eine immunhistochemische Färbung der Zellen auf CD31.

In Abbildung 23 ist die immunhistochemische Färbung von CD31 der HMECs auf PDMS dargestellt. CD31 ist in der Zellmembran lokalisiert und wird grün abgebildet. Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blau).

Abb. 23

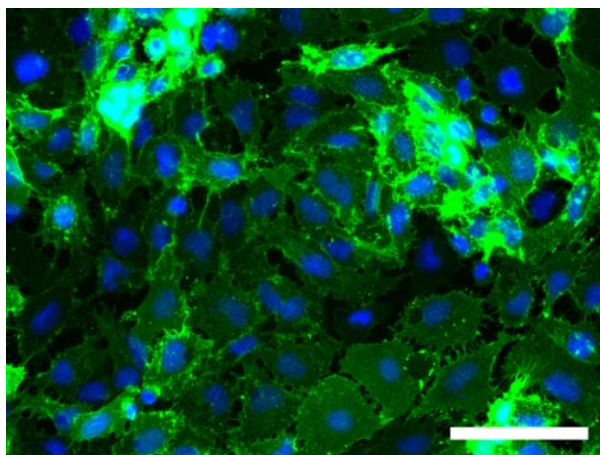


Abbildung 23 – HMEC

Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung von CD31 in HMECs nach Besiedelung auf PDMS: grün – CD31, blau – DAPI
Vergrößerung 400x (Maßbalken 50 µm)

3.3 Polymerversuche

Die Proliferation der MLE-12 Zellen nach Besiedelung auf die Polymerproben aus PDMS, rPDMS und PC (je $n = 3$) ohne Oberflächenbeschichtung ist visuell zunächst vergleichbar der auf den Kontrollen aus PS. Beim Wechsel des Kulturmediums oder bei Erschütterungen der Kulturgefäße kann allerdings wiederholt ein Ablösen der Zellschicht von der Oberfläche insbesondere des glatten PDMS beobachtet werden. Vor allem bei der Durchführung der Vitalitätsfärbung mittels des *Live/Dead assay* nach Ablauf von 7 Tagen kommt es durch mehrere Waschschriffe zu einem nahezu vollständigen Verlust der Zellen auf den Polymerproben aus PDMS und PC. Im Gegensatz dazu besteht auf der Oberfläche der Kontrollen aus PS eine wesentlich bessere Zellhaftung, und selbst bei Manipulationen im Rahmen der Vitalitätsfärbung ist visuell kein ausgeprägter Zellverlust zu verzeichnen. Eine Quantifizierung der

Zellproliferation ist dementsprechend auf den unbeschichteten Polymerproben nicht exakt möglich. Trotz dieser methodischen Einschränkung sind im Folgenden jeweils die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung und Zellzählung nach Zellverlust dargestellt. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung und Zellzählung auf PS denen auf PDMS, rPDMS und PC jeweils ohne Oberflächenbeschichtung gegenübergestellt.

Tab. 2

	Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PS vs. PDMS	0,071 vs. 0,009	P < 0,001	90,34 vs. 50,14	P < 0,001
PS vs. rPDMS	0,071 vs. 0,007	P < 0,001	90,34 vs. 50,96	P < 0,001
PS vs. PC	0,071 vs. 0,009	P < 0,001	90,34 vs. 48,06	P < 0,001

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 2 – Polymer ohne Oberflächenbeschichtung
 Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung
 von unbeschichtetem PS gegenüber unbeschichtetem PDMS, rPDMS, PC (n = 3)

Um ein besseres Anhaften der Zellen an der Oberfläche der verwendeten Polymere zu erreichen, wird eine Beschichtung der Polymerproben mit unterschiedlichen Proteinen der EZM vorgenommen (jeweils n = 3). Die Ergebnisse der Zellzählung der MLE-12 Zellen auf den einzelnen Polymerproben nach 7 Tagen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3

Polymer	Ohne*	Kollagen I [30 µg/ml]*	Kollagen I [15 µg/ml]*	Kollagen IV [18 µg/ml]*	Laminin [10 µg/ml]*	Fibronectin [7,5 µg/ml]*
PS	0,071 ± 0,008	0,056 ± 0,002	0,067 ± 0,001	0,083 ± 0,010	0,078 ± 0,009	0,078 ± 0,014
PDMS	0,009 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,043 ± 0,006	0,073 ± 0,015	0,075 ± 0,006	0,075 ± 0,015
rPDMS	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,000	0,051 ± 0,005	0,077 ± 0,004	0,075 ± 0,003	0,077 ± 0,002
PC	0,009 ± 0,003	0,005 ± 0,003	0,007 ± 0,001	0,073 ± 0,003	0,076 ± 0,011	0,066 ± 0,009

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

Tabelle 3 – Polymerversuche: Zellzahl

Zellzahl der Zellpopulationen 7 Tage nach
Besiedelung von PS, PDMS, rPDMS, PC (n = 3)

Durch die Beschichtung der Polymerproben aus PDMS, rPDMS und PC mit unterschiedlichen Proteinen der EZM kann eine Verbesserung der Proliferations- und Adhäsionseigenschaften der MLE-12 Zellen erreicht werden. Insbesondere die Beschichtung der Polymerproben mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin bewirkt eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl der MLE-12 Zellen im Vergleich zu den unbeschichteten Polymerproben (z.B. 0,073 vs. 0,009 x 10⁶ Zellen, p = 0,002 auf PDMS im Vergleich von Kollagen IV vs. unbehandelte Oberfläche, 0,075 vs. 0,009 x 10⁶ Zellen, p < 0,001 auf PDMS im Vergleich von Laminin vs. unbehandeltem Polymer und 0,075 vs. 0,009 x 10⁶ Zellen, p = 0,001 auf PDMS im Vergleich von Fibronectin vs. unbehandeltem Oberfläche). Die Ergebnisse der Beschichtung mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin sind vergleichbar mit denen der Positivkontrolle auf beschichtetem bzw. unbehandeltem PS (z.B. 0,075 vs. 0,078 x 10⁶ Zellen, p = 0,791 im Vergleich von PDMS vs. PS beschichtet mit jeweils Fibronectin und 0,075 vs. 0,071 x 10⁶ Zellen, p = 0,742 im Vergleich von PDMS beschichtet mit Fibronectin vs. unbehandeltem PS). Durch die Beschichtung der Polymerproben mit Kollagen I in der Konzentration von 30

$\mu\text{g/ml}$ kann hingegen kein Vorteil gegenüber den unbehandelten Polymerproben erzielt werden. Die Gesamtzellzahlen nach 7 Tagen sind vergleichbar oder sogar geringer als bei den Negativkontrollen ohne Beschichtung (z.B. $0,007$ vs. $0,009 \times 10^6$ Zellen, $p = 0,101$ im Vergleich von PDMS beschichtet mit Kollagen I [$30 \mu\text{g/ml}$] vs. unbehandelter Oberfläche). Bei der Verwendung von Kollagen I in der Konzentration von $15 \mu\text{g/ml}$ kann zwar wiederum eine größere Gesamtzellzahl erreicht werden, als bei der Konzentration von $30 \mu\text{g/ml}$, allerdings noch deutlich unter der Zellzahl auf den Polymerproben nach Beschichtung durch Kollagen IV, Laminin oder Fibronectin (z.B. $0,043$ vs. $0,009 \times 10^6$ Zellen, $p < 0,001$ im Vergleich von PDMS beschichtet mit Kollagen I [$15 \mu\text{g/ml}$] vs. unbehandelter Oberfläche und $0,043$ vs. $0,075 \times 10^6$ Zellen, $p = 0,003$ im Vergleich von PDMS beschichtet mit Kollagen I [$15 \mu\text{g/ml}$] vs. Laminin). In Abbildung 24 ist die Gesamtzahl der MLE-12 Zellen nach 7 Tagen Kultur auf den einzelnen Polymerproben dargestellt.

Abb. 24

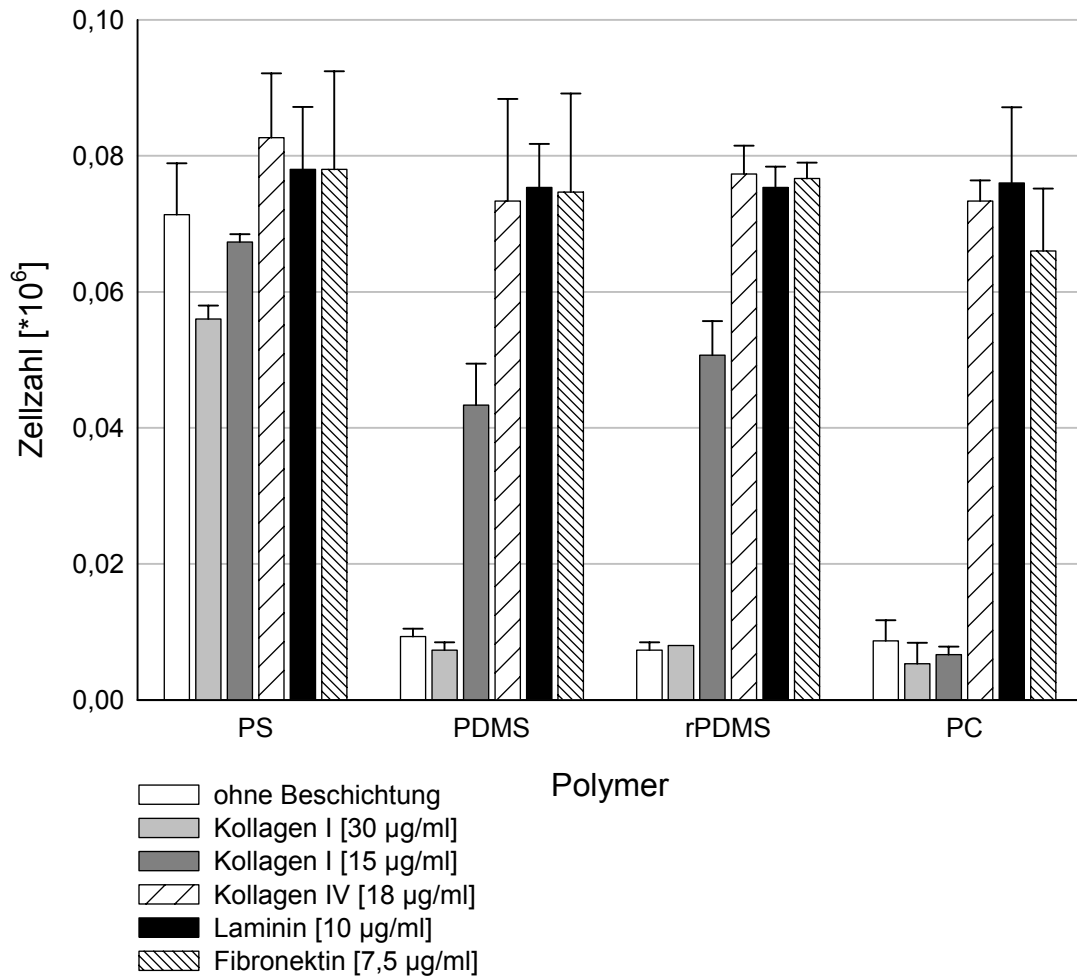


Abbildung 24 – Polymerversuche: Zellzahl

Anzahl der MLE-12 Zellen 7 Tage nach Besiedelung von beschichtetem PS, PDMS, rPDMS und PC (n = 3; Standardabweichung).

Durch Beschichtung der Polymerproben mit Kollagen IV, Laminin und Fibronektin kann neben der Zellzahl auch die Vitalität der MLE-12 Zellen gesteigert werden. Nach Vitalitätsfärbung der Polymerproben mittels des *Live/Dead* assay werden jeweils 5 exemplarische Aufnahmen ausgewertet und die Vitalität der Zellen berechnet. Die Ergebnisse der Vitalitätsmessung der MLE-12 Zellen auf den einzelnen Polymerproben nach 7 Tagen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4

Polymer	Ohne*	Kollagen I [30 µg/ml]*	Kollagen I [15 µg/ml]*	Kollagen IV [18 µg/ml]*	Laminin [10 µg/ml]*	Fibronectin [7,5 µg/ml]*
PS	90,34 ± 3,23	71,80 ± 2,89	74,71 ± 1,09	96,25 ± 2,09	95,60 ± 3,42	95,36 ± 2,68
PDMS	50,14 ± 2,68	48,15 ± 2,77	74,20 ± 4,41	92,73 ± 3,02	96,73 ± 2,19	95,30 ± 2,41
rPDMS	50,96 ± 1,99	50,41 ± 1,94	68,95 ± 1,73	92,49 ± 1,12	95,99 ± 1,98	91,93 ± 3,41
PC	48,06 ± 5,45	41,95 ± 3,55	49,47 ± 1,98	94,19 ± 1,98	95,71 ± 3,17	94,08 ± 1,79

* Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 4 – Polymerversuche: Vitalität

Zellvitalität der Zellpopulationen 7 Tage nach Besiedelung von beschichtetem PS, PDMS, rPDMS, PC (n = 3)

Im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne Oberflächenbeschichtung zeigt sich der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl auf den mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin beschichteten Polymerproben signifikant verbessert (z.B. 92,73 vs. 50,14 % Vitalität, $p < 0,001$ auf PDMS im Vergleich von Kollagen IV vs. unbehandelte Oberfläche). Die Vitalität liegt im Bereich der Positivkontrollen aus PS (z.B. 92,73 vs. 96,25 % Vitalität, $p = 0,177$ im Vergleich von PDMS vs. PS, jeweils beschichtet mit Kollagen IV und 92,73 vs. 90,34 % Vitalität, $p = 0,394$ im Vergleich von PDMS, beschichtet mit Kollagen IV vs. PS mit unbehandelte Oberfläche). Im Gegensatz dazu führt die Verwendung von Kollagen I in den zwei untersuchten Konzentrationen wiederum zu einer geringeren Vitalität der MLE-12 Zellen nach 7 Tagen. Auch die Beschichtung von PS insbesondere mit Kollagen I in der höheren Konzentration von 30 µg/ml führt zu einer deutlichen Abnahme der Zellvitalität (71,80 vs. 90,34 % Vitalität, $p = 0,002$ auf PS im Vergleich von Kollagen I [30 µg/ml] vs. unbehandelte Oberfläche). In Abbildung 25 ist die Vitalität der MLE-12 Zellen nach 7 Tagen Kultur auf den einzelnen Polymerproben dargestellt.

Abb. 25

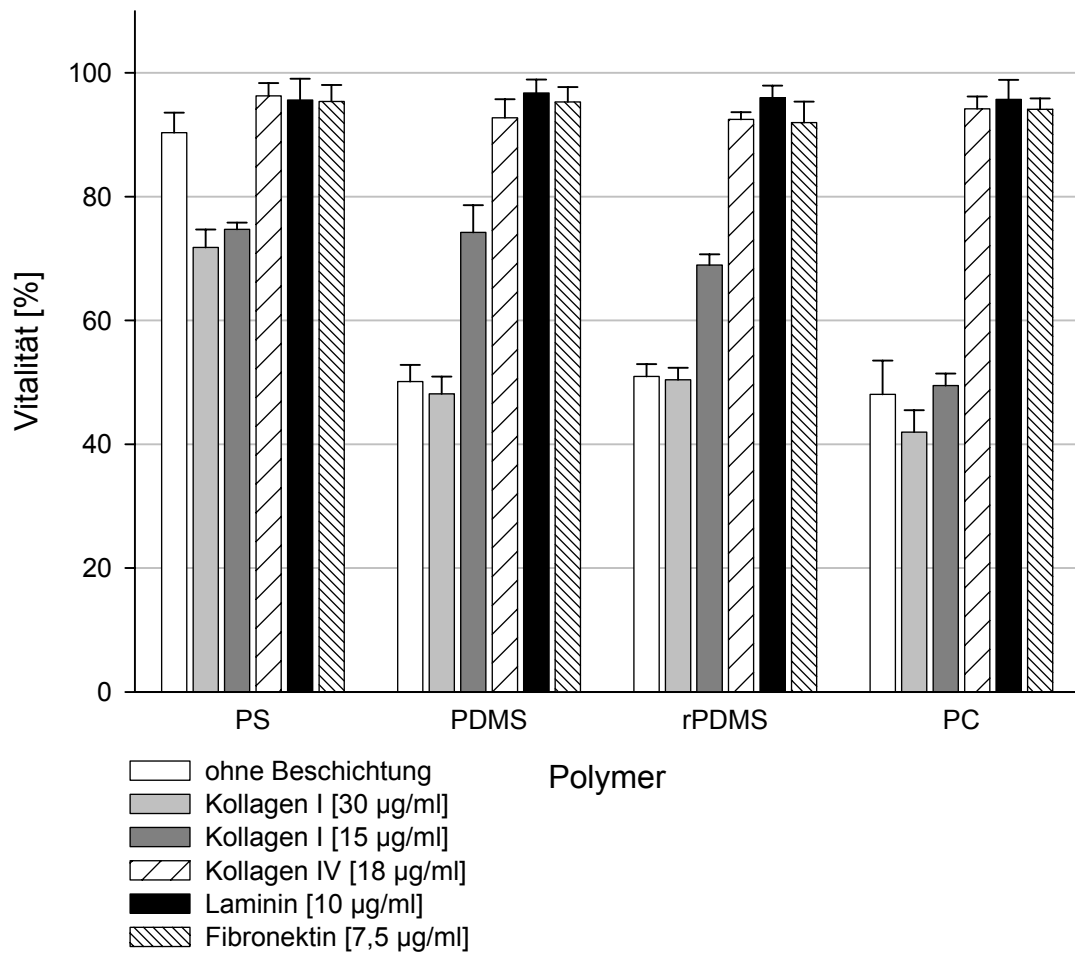


Abbildung 25 – Polymerversuche: Vitalität

Vitalität der MLE-12 Zellen 7 Tage nach Besiedelung von beschichtetem PS, PDMS, rPDMS und PC (n = 3; Standardabweichung).

Um den Vorteil der Oberflächenbeschichtung der Polymerproben im Hinblick auf die Proliferations- und Adhäsionseigenschaften der MLE-12 Zellen zu verdeutlichen, wird die Vitalität der Zellen mit der Gesamtzellzahl multipliziert. Das Produkt der Vitalität und der Gesamtzellzahl ist eine Näherung der Anzahl der vitalen Zellen der jeweiligen Zellpopulation, die eine weitere Proliferation der Zellpopulation ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Abb. 26

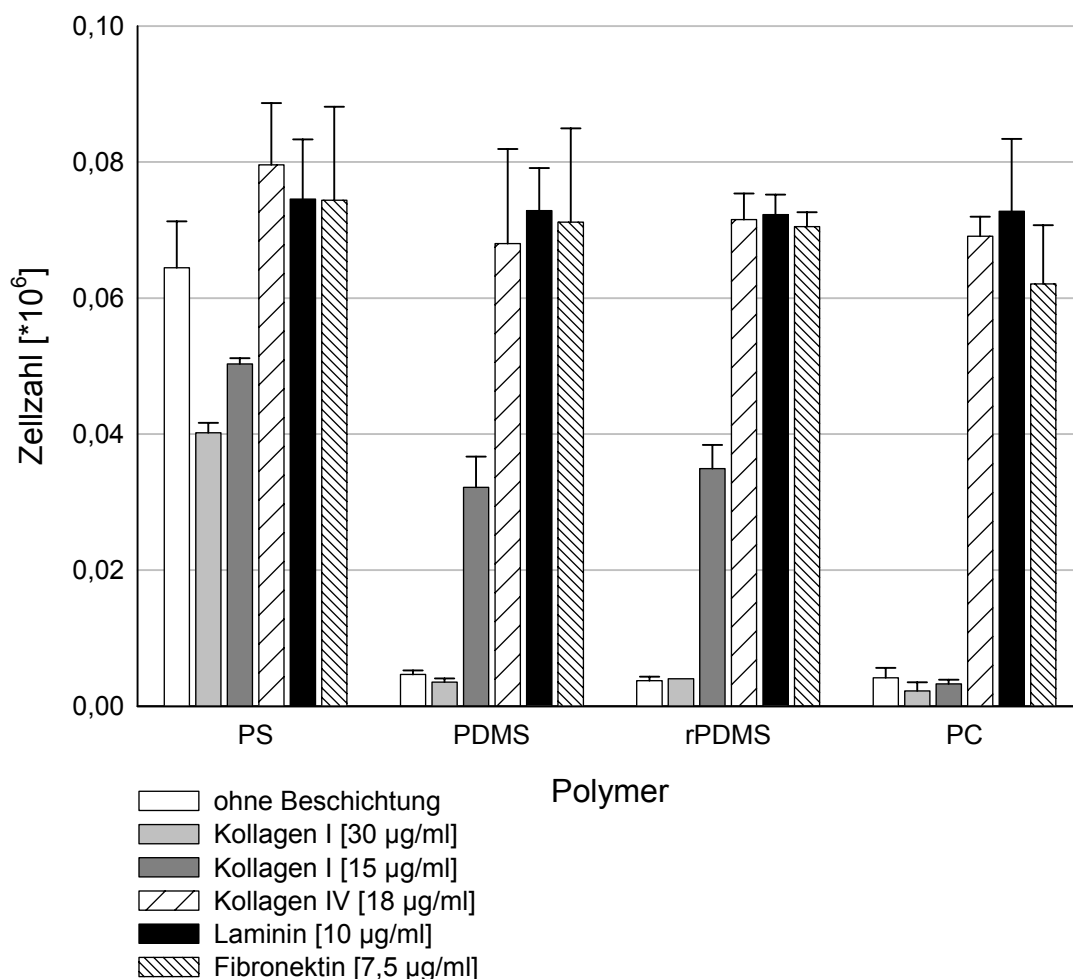


Abbildung 26 – Polymerversuche: vitale Zellen

Anzahl der vitalen MLE-12 Zellen 7 Tage nach Besiedelung von beschichtetem PS, PDMS, rPDMS und PC (n = 3 ; Standardabweichung).

Da sich bei den Polymerversuchen für die Verwendung des rPDMS gegenüber dem PDMS keine wesentlichen Vorteile in Hinblick auf die Proliferation und Adhäsion der MLE-12 Zellen zeigen lassen (z.B. 0,073 vs. 0,077 x 10⁶ Zellen, p = 0,680 im Vergleich von PDMS vs. rPDMS beschichtet mit jeweils Kollagen IV und 92,73 vs. 92,49 % Vitalität, p = 0,856 im Vergleich von PDMS vs. rPDMS beschichtet mit jeweils Kollagen IV) und die Implementierung der aufgerauten Oberfläche des rPDMS in das

parenchymale Kompartiment der Zweikammersysteme einen noch komplexeren Herstellungsprozess der Zweikammersysteme (siehe Kap. 2.1.2) bedeutet würde, wird die Verwendung des rPDMS nicht weiter verfolgt. In Tabelle 5 ist der Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung der Polymerproben aus PDMS gegenüber rPDMS dargestellt.

Tab. 5

		Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PDMS	vs. rPDMS				
o. Beschichtung	o. Beschichtung	0,009 vs. 0,007	P = 0,101	50,14 vs. 50,96	P = 0,603
PDMS	vs. rPDMS				
Kollagen I [30 μ g/ml]	Kollagen I [30 μ g/ml]	0,007 vs. 0,008	P = 0,374	48,15 vs. 50,41	P = 0,678
PDMS	vs. rPDMS				
Kollagen I [15 μ g/ml]	Kollagen I [15 μ g/ml]	0,043 vs. 0,051	P = 0,184	74,20 vs. 68,95	P = 0,293
PDMS	vs. rPDMS				
Kollagen IV	Kollagen IV	0,073 vs. 0,077	P = 0,680	92,73 vs. 92,49	P = 0,856
PDMS	vs. rPDMS				
Laminin	Laminin	0,075 vs. 0,075	P = 1,000	96,72 vs. 95,99	P = 0,674
PDMS	vs. rPDMS				
Fibronectin	Fibronectin	0,075 vs. 0,077	P = 0,825	95,30 vs. 91,93	P = 0,229

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 5 – PDMS vs. rPDMS

Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung von PDMS gegenüber rPDMS (n = 3)

In Tabelle 6a ist für PDMS der Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung der Negativkontrolle (unbehandeltem PDMS) gegenüber PDMS mit Oberflächenbeschichtung (Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin) dargestellt. Tabelle 6b zeigt für PDMS den Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung der Positivkontrolle (unbeschichtetes PS) gegenüber PDMS.

Tab. 6a

	Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PDMS				
o. Beschichtung vs. Kollagen I [30 $\mu\text{g/ml}$]	0,009 vs. 0,007	P = 0,101	50,14 vs. 48,15	P = 0,701
PDMS				
o. Beschichtung vs. Kollagen I [15 $\mu\text{g/ml}$]	0,009 vs. 0,043	P < 0,001	50,14 vs. 74,20	P = 0,003
PDMS				
o. Beschichtung vs. Kollagen IV	0,009 vs. 0,073	P = 0,002	50,14 vs. 92,73	P < 0,001
PDMS				
o. Beschichtung vs. Laminin	0,009 vs. 0,075	P < 0,001	50,14 vs. 96,73	P < 0,001
PDMS				
o. Beschichtung vs. Fibronectin	0,009 vs. 0,075	P = 0,001	50,14 vs. 95,30	P < 0,001

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 6a – PDMS ohne vs. mit Oberflächenbeschichtung
 Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung
 von unbeschichtetem PDMS gegenüber beschichtetem PDMS (n = 3)

Tab. 6b

		Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	o. Beschichtung	0,071 vs. 0,009	P < 0,001	90,34 vs. 50,14	P < 0,001
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	Kollagen I [30 $\mu\text{g/ml}$]	0,071 vs. 0,007	P < 0,001	90,34 vs. 48,15	P < 0,001
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	Kollagen I [15 $\mu\text{g/ml}$]	0,071 vs. 0,043	P = 0,008	90,34 vs. 74,20	P = 0,011
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	Kollagen IV	0,071 vs. 0,073	P = 0,847	90,34 vs. 92,73	P = 0,394
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	Laminin	0,071 vs. 0,075	P = 0,524	90,34 vs. 96,73	P = 0,042
PS	vs. PDMS				
o. Beschichtung	Fibronectin	0,071 vs. 0,075	P = 0,742	90,34 vs. 95,30	P = 0,094

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 6b – PS vs. PDMS
 Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung
 von PS gegenüber beschichtetem PDMS (n = 3)

In Tabelle 7a ist für PC der Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung der Negativkontrolle (unbehandeltem PC) gegenüber PC mit Oberflächenbeschichtung (Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin) dargestellt. Tabelle 7b zeigt für PC den Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung der Positivkontrolle (unbeschichtetes PS) gegenüber PC.

Tab. 7a

	Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PC				
o. Beschichtung vs. Kollagen I [30 $\mu\text{g/ml}$]	0,009 vs. 0,005	P = 0,252	48,06 vs. 41,95	P = 0,110
PC				
o. Beschichtung vs. Kollagen I [15 $\mu\text{g/ml}$]	0,009 vs. 0,007	P = 0,349	48,06 vs. 49,47	P = 0,400
PC				
o. Beschichtung vs. Kollagen IV	0,009 vs. 0,073	P < 0,001	48,06 vs. 94,19	P < 0,001
PC				
o. Beschichtung vs. Laminin	0,009 vs. 0,076	P < 0,001	48,06 vs. 95,71	P < 0,001
PC				
o. Beschichtung vs. Fibronectin	0,009 vs. 0,066	P < 0,001	48,06 vs. 94,08	P < 0,001

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 7a – PC ohne vs. mit Oberflächenbeschichtung

Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung von unbeschichtetem PC gegenüber beschichtetem PC (n = 3)

Tab. 7b

		Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	o. Beschichtung	0,071 vs. 0,009	P < 0,001	90,34 vs. 48,06	P < 0,001
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	Kollagen I [30 $\mu\text{g/ml}$]	0,071 vs. 0,005	P < 0,001	90,34 vs. 41,95	P < 0,001
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	Kollagen I [15 $\mu\text{g/ml}$]	0,071 vs. 0,007	P < 0,001	90,34 vs. 49,47	P < 0,001
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	Kollagen IV	0,071 vs. 0,073	P = 0,693	90,34 vs. 94,19	P = 0,140
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	Laminin	0,071 vs. 0,076	P = 0,581	90,34 vs. 95,71	P = 0,105
PS	vs. PC				
o. Beschichtung	Fibronektin	0,071 vs. 0,066	P = 0,481	90,34 vs. 94,08	P = 0,149

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 7b – PS vs. PC

Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung
von PS gegenüber beschichtetem PC (n = 3)

In Abbildung 27 sind exemplarisch Aufnahmen der Vitalitätsfärbung der MLE-12 Zellen auf den verwendeten Polymeren mit unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen dargestellt.

Abb. 27

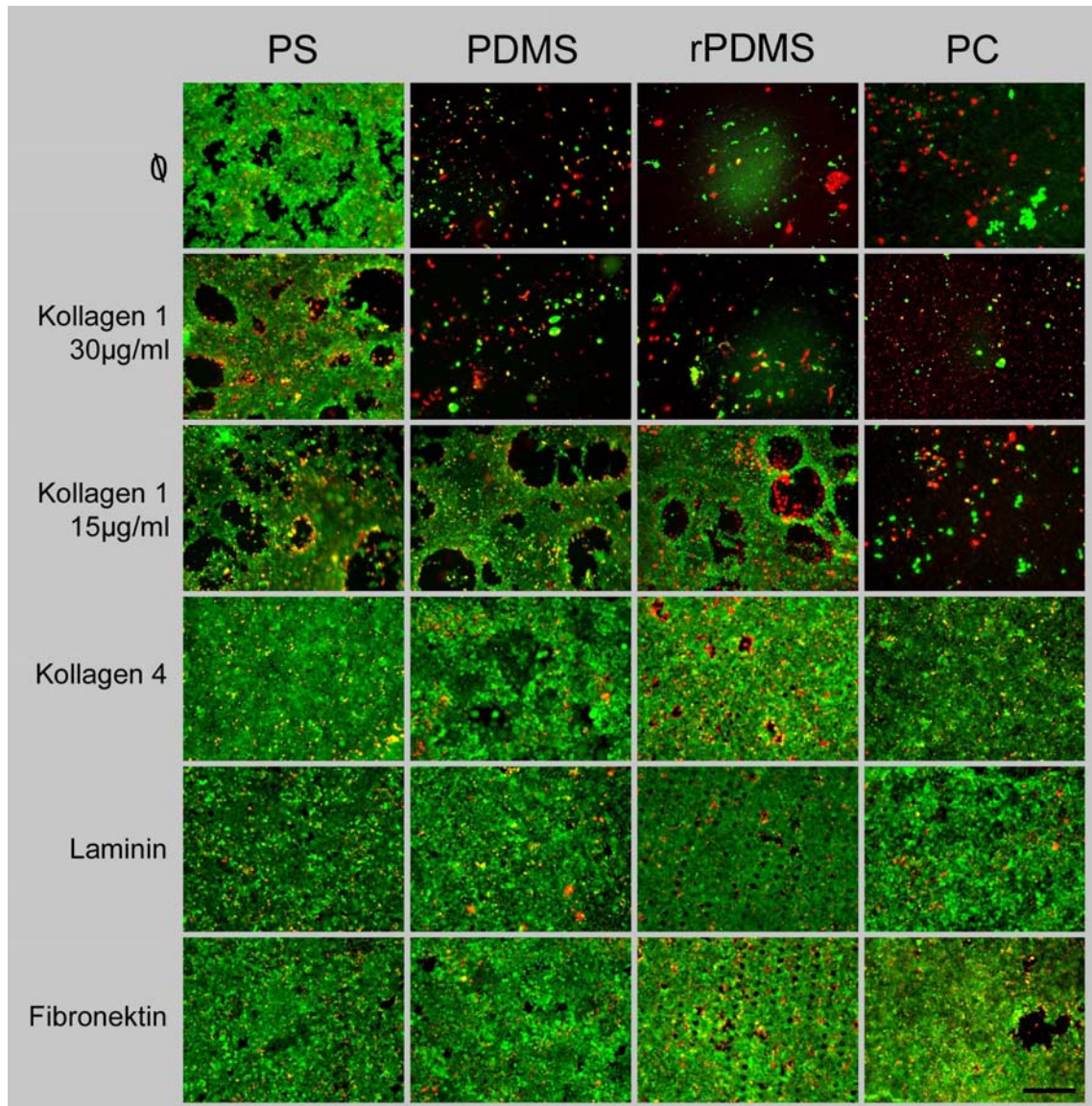


Abbildung 27 – Polymerversuche: Live/Dead

Exemplarische Darstellung der Vitalitätsfärbung der Polymerproben (PS, PDMS, rPDMS und PC) mit unterschiedlichen Beschichtungen der Polymeroberfläche (ohne Beschichtung, Kollagen I – 30 µg/ml, Kollagen I – 15 µg/ml, Kollagen IV – 18 µg/ml, Laminin – 10 µg/ml, Fibronektin – 7,5 µg/ml) 7 Tage nach Besiedelung: grün – vital; rot - avital. Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

Bei der Auswertung der Polymerversuche kann ein Vorteil der Oberflächenbeschichtung der verwendeten Polymere mit Kollagen IV, Laminin und Fibronektin im Hinblick auf Proliferation und Adhäsion der MLE-12 Zellen gegenüber der unbeschichteten Polymerproben gezeigt werden. Durch diese Maßnahme kann eine Zellproliferation der

MLE-12 Zellen soweit verbessert werden, dass die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung und Zellzählung in der Größenordnung der Zellkultur auf PS liegen. Unterschiede zwischen Kollagen IV, Laminin oder Fibronectin können in den durchgeführten Polymerversuchen nicht gezeigt werden. In Tabelle 8a ist für PDMS der Vergleich von Zellzahl und Vitalität nach Beschichtung mit Kollagen IV gegenüber Laminin und Fibronectin dargestellt. Tabelle 8b zeigt den selben Vergleich für PC.

Tab. 8a

		Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PDMS	vs. PDMS				
Kollagen IV	Laminin	0,073 vs. 0,075	P = 0,842	92,73 vs. 96,73	P = 0,142
PDMS	vs. PDMS				
Kollagen IV	Fibronectin	0,073 vs. 0,075	P = 0,917	92,73 vs. 95,30	P = 0,325
PDMS	vs. PDMS				
Laminin	Fibronectin	0,075 vs. 0,075	P = 0,945	96,73 vs. 95,30	P = 0,493

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus je 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 8a – PDMS: Kollagen IV vs. Laminin vs. Fibronectin

Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung von PDMS beschichtet mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (n = 3)

Tab. 8b

		Zellzahl [$\times 10^6$]*	t-test	Vitalität [%]**	t-test
PC	vs. PC				
Kollagen IV	Laminin	0,073 vs. 0,076	P = 0,710	94,19 vs. 95,71	P = 0,527
PC	vs. PC				
Kollagen IV	Fibronectin	0,073 vs. 0,066	P = 0,259	94,19 vs. 94,08	P = 0,904
PC	vs. PC				
Laminin	Fibronectin	0,076 vs. 0,066	P = 0,296	95,71 vs. 94,08	P = 0,467

* Mittelwert und Standardabweichung bei n = 3

** Mittelwert und Standardabweichung aus je 5 Aufnahmen bei n = 3

Tabelle 8b – PC: Kollagen IV vs. Laminin vs. Fibronectin

Vergleich von Zellzahl und Vitalität 7 Tage nach Besiedelung
von PC beschichtet mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (n = 3)

Bei den Zellzählungen bzw. den Vitalitätsbestimmungen kann zwar kein signifikanter Vorteil von Laminin gegenüber Kollagen IV und Fibronectin gezeigt werden, die Ergebnisse bilden allerdings eine schwache Tendenz in Richtung einer verbesserten Zellproliferation und –adhäsion auf den mit Laminin beschichteten Polymeroberflächen ab. In den folgenden Experimenten werden die verwendeten Polymerkonstrukte daher mit Laminin in einer Konzentration von 10µg/ml beschichtet.

3.4 Mikroträger

Um bei den vorliegenden Experimenten Mikroträger gleicher Größe verwenden zu können, erfolgt ein wiederholtes mechanisches Sieben. Hierdurch kann eine Größentrennung in 4 Gruppen (Gruppe A: Durchmesser > 250 µm, B: 212 µm – 250 µm, C: 180 µm – 212 µm, D: < 180 µm) erreicht werden. Stichproben (n = 30) der einzelnen Gruppen werden lichtmikroskopisch untersucht und vermessen. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Die einzelnen Gruppen sind hoch signifikant verschieden.

Abb. 28

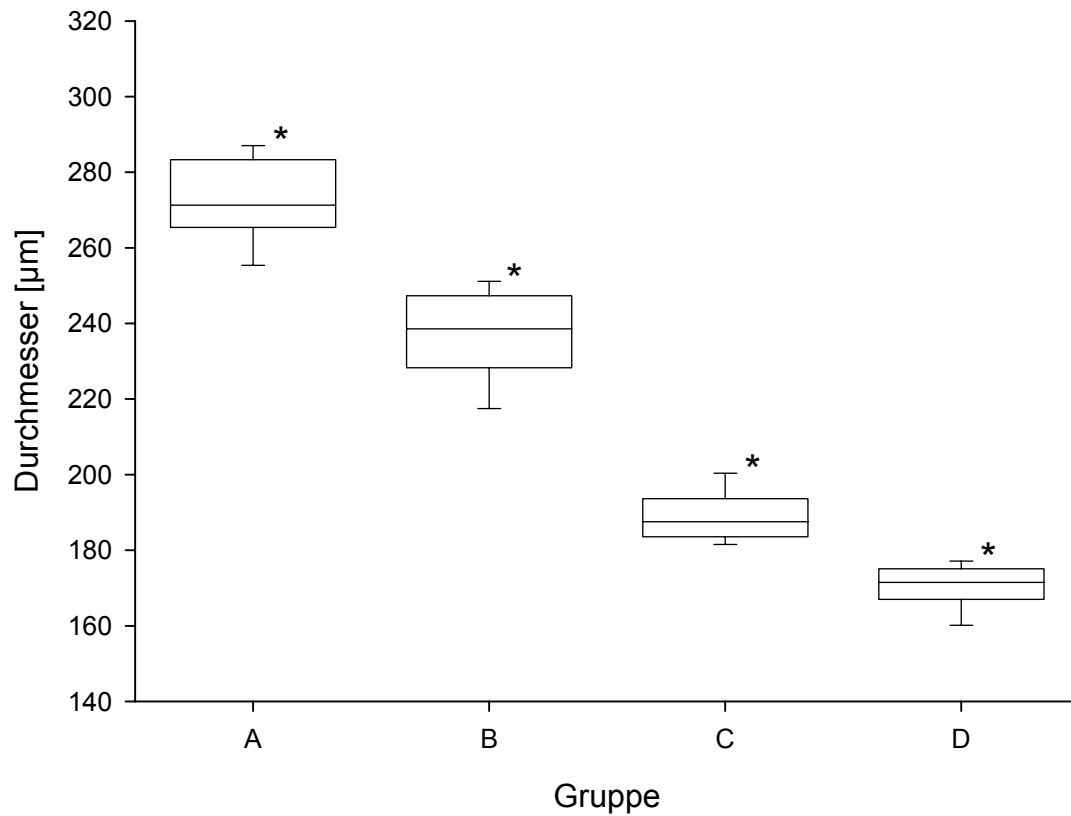


Abbildung 28 – Mikroträger: Größentrennung

Größenverteilung der Mikroträger in den einzelnen Gruppen A - D.
Der Durchmesser in den einzelnen Gruppen unterscheidet sich signifikant ($p < 0,01$).

In den Experimenten dieser Arbeit werden ausschließlich Mikroträger der Gruppe A mit einem Durchmesser $> 250 \mu\text{m}$ verwendet. Diese haben einem Durchmesser von durchschnittlich $272,2 \mu\text{m} \pm 13,5 \mu\text{m}$.

3.5 Evaluation

Die Evaluierung der besiedelten Polymerkonstrukte umfasst morphometrische Bildanalysen, DNS Messungen, Vitalitätstests, immunhistochemische Färbungen und Rasterelektronenmikroskopie (REM).

Während des Versuchszeitraums werden die Polymerkonstrukte im Abstand von 24 Stunden dem Inkubator entnommen und mikroskopisch beurteilt. Am Tag der Besiedelung zeigen sich hierbei die in Gruppen oder vereinzelt liegenden Mikroträger im parenchymalen Kompartiment. Auf der Oberfläche der Mikroträger sind die anhaftenden Zellen als flächiges grün fluoreszierendes Signal zu erkennen.

Abb. 29

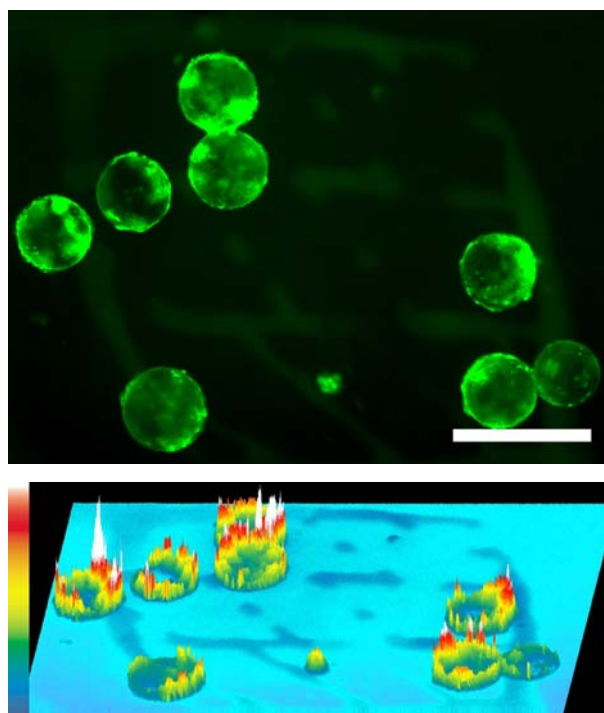


Abbildung 29 – Besiedelung, t = 0

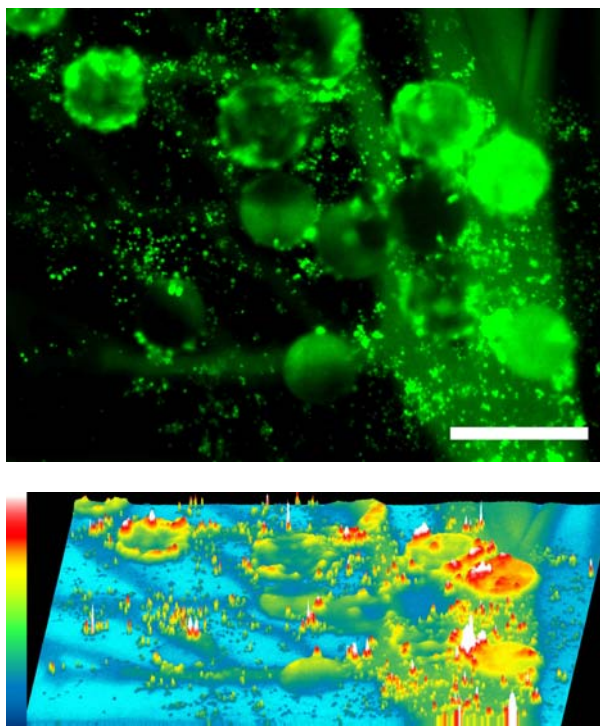
Nach der Besiedelung bewegen sich die Mikroträger frei im parenchymalen Kompartiment. Fluoreszenzmikroskopie (oben) und als Profil der Fluoreszenzintensität (unten). Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Zu diesem frühen Zeitpunkt des Experimentes haften die Mikrosphären noch nicht auf der PC Membran und bewegen sich bei Erschütterungen und Lageänderungen frei innerhalb des parenchymalen Kompartimentes (siehe Abbildung 29).

Wegen der geringen Tiefenschärfe des Mikroskops in Vergleich zum Durchmesser der Mikrosphären ist die scharfe Abbildung der Oberfläche der PC-Membran und die Zellen auf den Mikrosphären in derselben Aufnahme nicht zu erreichen, sondern kann nur in unterschiedlichen optischen Ebenen dargestellt werden. Fluoreszierende Strukturen außerhalb dieser Brennebene erscheinen daher auf den Abbildungen unscharf und weniger intensiv. Um die Verbreitung der fluoreszierenden Zellen innerhalb der parenchymalen Kammer besser beurteilen zu können, kann mit MetaMorph ein dreidimensionales Profil der Fluoreszenzintensität der Aufnahmen erstellt werden. Hierdurch ist es möglich, bereits geringe fluoreszierende Signale auch außerhalb der Brennebene optisch zu verdeutlichen.

Bereits nach 24 Stunden erscheint die Mehrzahl der Mikroträger auf der PC-Membran fixiert und nach 48 Stunden werden vereinzelt Zellen im Umfeld einzelner Mikrosphären erkennbar. Im Laufe der folgenden Tage proliferieren immer mehr Zellen von der Oberfläche der Mikrosphären auf die PC-Membran und bilden dort eine lockere Zellschicht. Nach 96 Stunden (siehe Abbildung 30) zeigt sich in der Umgebung der Mikrosphären ein zunehmend dichter Zellrasen, der sich über das gesamte Kompartiment ausbreitet.

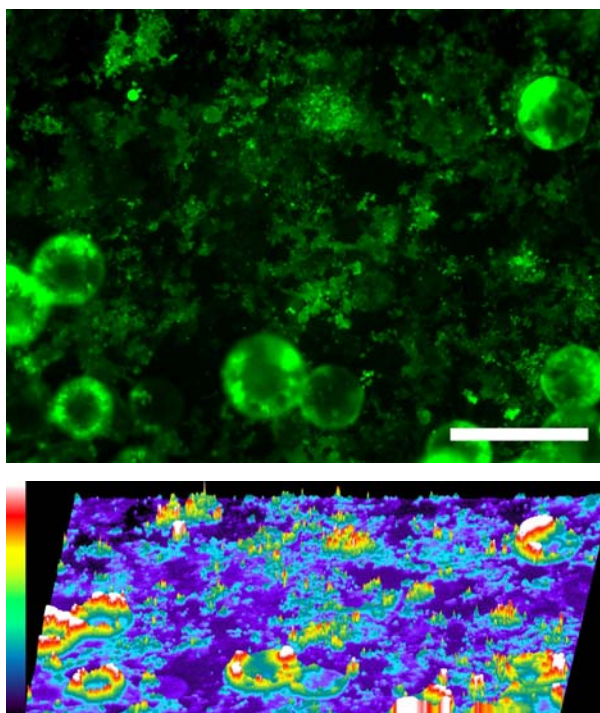
Abb. 30

**Abbildung 30 – Beurteilung nach 4 Tagen, $t = 96$**

Mikrosphären und die im parenchymalen Kompartiment proliferierten Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie (oben) und als Profil der Fluoreszenz (unten). In der näheren Umgebung der Mikrosphären breiten sich die Zellen über die PC-Membran aus.
Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 μm)

Nach 5 Tagen sind die Areale der PC-Membran zwischen den Mikrosphären mit einer weitgehend konfluenten Zellschicht bedeckt und bei Abschluss der Konditionierungsphase nach 7 Tagen wirken die parenchymalen Kompartimente größtenteils mit Zellen gefüllt (siehe Abbildung 31).

Abb. 31

Abbildung 31 – Beurteilung nach 7 Tagen, $t = 168$

Mikrosphären und die über die PC-Membran proliferierten Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie (oben) und als Profil der Fluoreszenz (unten). Der Boden des parenchymalen Kompartimentes erscheint weitestgehend mit Zellen bedeckt.
Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 μm)

3.5.1 DNS Messung

Der DNS Gehalt von $0,5 \times 10^6$ bis $2,0 \times 10^6$ MLE-12 Zellen dient als Standard für die DNS Messung und ist in einer Standardkurve zusammengefasst (siehe Abbildung 32). Anhand dieser Standardkurve ($y = 30,943 x$; $R^2 = 0,9794$) können die Zellzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes ermittelt werden. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} als Indikator für die Reinheit der untersuchten Proben liegt zwischen 1,76 bei 2×10^6 Zellen und 1,96 bei $0,5 \times 10^6$ Zellen – ein Anhalt dafür, dass die Proben des DNS Standards nur geringfügige Verunreinigungen aufweisen.

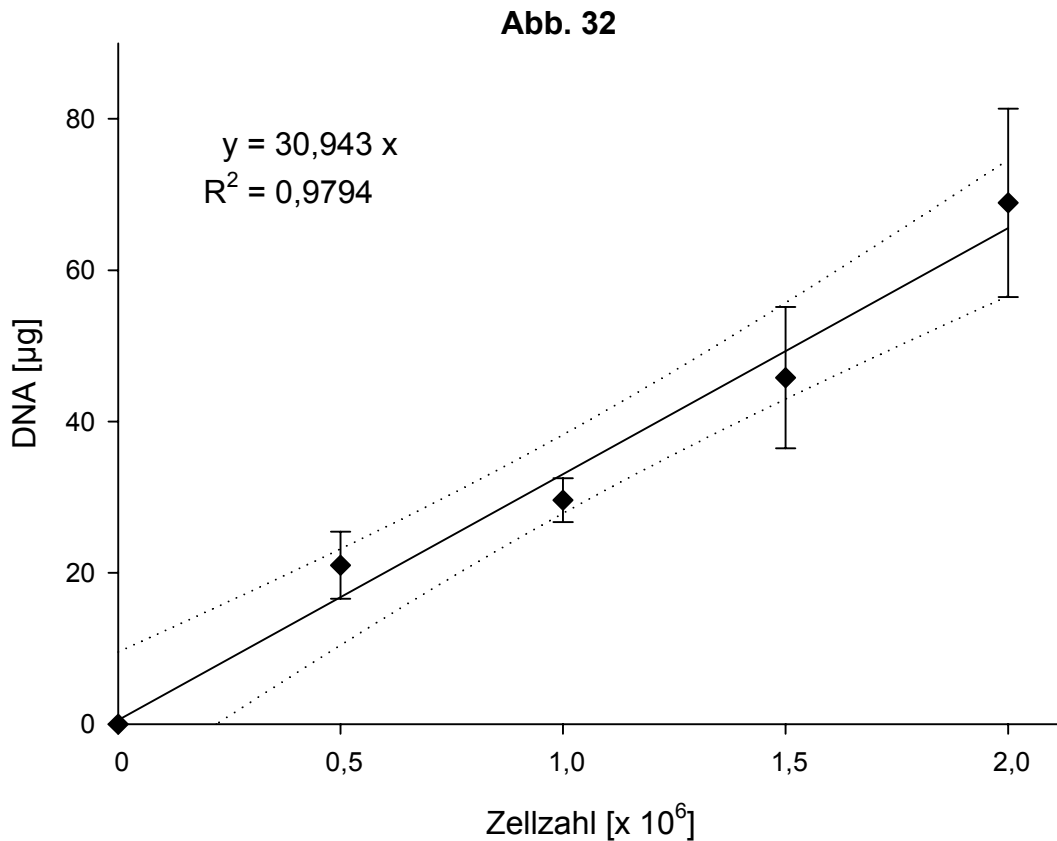


Abbildung 32 – DNS Standard, Quiagen DNeasy

Die Menge DNS [μg] in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Zellzahl für den Bereich von 0 bis $2,0 \times 10^6$ Zellen mit der ermittelten Regressionsgerade und 95 % Konfidenzintervall.

Als Ausgangswert für Vergleiche der Zellzahlen wird die DNS Messung in der Suspension aus beladenen Mikroträgern zum Zeitpunkt der Besiedelung zugrunde gelegt. Mit einer A_{260} von $0,337 \pm 0,0454$ beträgt sie $1,0880 \times 10^6$ /ml Zellen. Während der dynamischen Kultur kommt es zu einer Vermehrung der Zellen auf den Mikroträgern von $0,1816 \times 10^6$ /ml Zellen auf nahezu das 6fache. Bei einer Menge von $300 \mu\text{l}$ Suspension für die Besiedelung werden somit insgesamt $0,3264 \times 10^6$ Zellen pro Polymerkonstrukt besiedelt.

Tab. 9

Konstrukt #	Absorption bei 260 nm (A_{260}) [†]	DNS [μg]	Zellzahl	% von Ausgangswert
1	0,248 \pm 0,023	49,5	1,61 x 10 ⁶	492
2	0,154 \pm 0,043	30,7	0,99 x 10 ⁶	304
3	0,211 \pm 0,037	42,2	1,36 x 10 ⁶	418
4	0,324 \pm 0,032	64,7	2,09 x 10 ⁶	640
5	0,071 \pm 0,026	14,2	0,46 x 10 ⁶	141
neg 1	0,002 \pm 0,003	0,23	0,008 x 10 ⁶	2,3
neg 2	0,018 \pm 0,009	1,83	0,059 x 10 ⁶	18,2
neg 3	0,010 \pm 0,003	1,03	0,033 x 10 ⁶	10,2

[†] Mittelwert und Standardabweichung bei Dreifachmessung

Tabelle 9 – Ergebnisse, Quiagen DNeasy

Absorption bei 260 nm für die einzelnen Polymerkonstrukte und statischen Kontrollen mit den korrespondierenden Werten für die DNS Menge und den daraus abgeleiteten Zellzahlen.

Die Ergebnisse der DNS Messungen für die einzelnen Polymerkonstrukte sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Proben von Polymerkostrukt 1 weisen eine mittlere A_{260} von 0,248 \pm 0,0231 auf, was bei der verwendeten Verdünnung von 1:20 einer DNS Konzentration von 247,667 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht. Die DNS Menge innerhalb des Polymerkonstruktes wird bei einem Gesamtvolumen von 200 μl mit 49,533 μg errechnet und korrespondiert mit 1,6059 x 10⁶ Zellen. Dies bedeutet einen Zuwachs der Zellen auf 492 % der ursprünglich besiedelten Zellzahl.

In den perfundierten Polymerkonstrukten (1 - 5) kann nach der Konditionierung somit ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen gezeigt werden. Die Proliferation der Zellen erreicht im Mittel das 4fache des Ausgangswertes bei Besiedelung. Im Gegensatz dazu bleibt in den Polymerkonstrukten mit statischen Kulturbedingungen eine Proliferation

der Zellen aus. Bei der DNS Messung kann eine Reduktion der Zellzahl auf maximal 18% des Ausgangswertes gezeigt werden (siehe Abbildung 33).

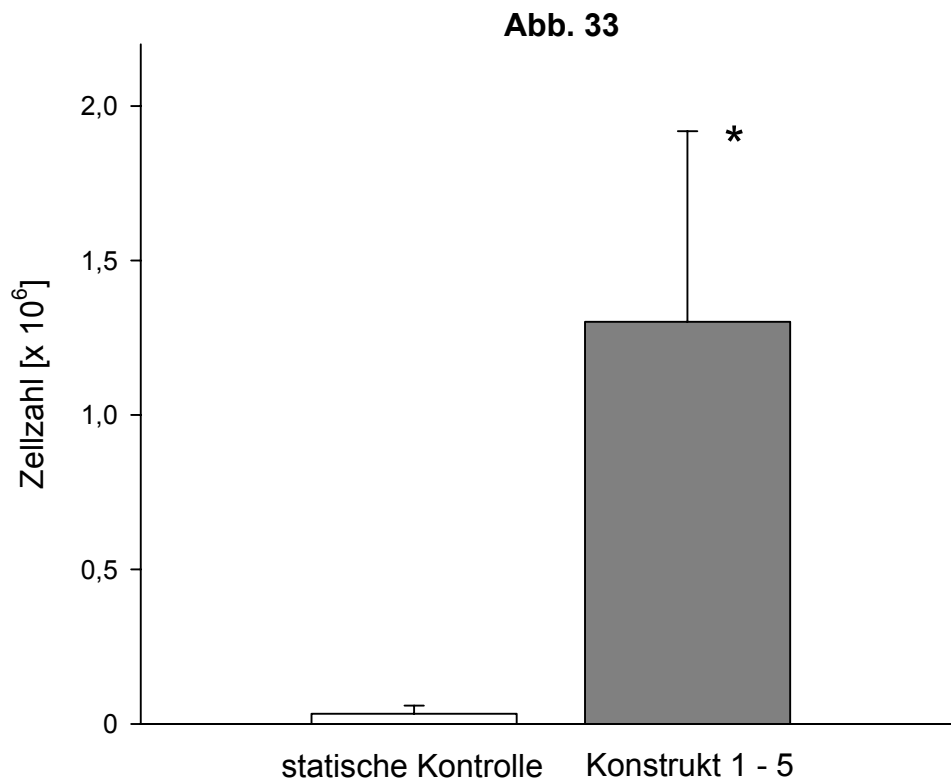


Abbildung 33 – Ergebnisse, Quiagen DNeasy

Vergleich der Zellzahl der Kontrollgruppe mit statischen Kulturbedingungen und den Zellzahlen der perfundierten Polymerkonstrukte nach Abschluss der Konditionierungsphase (* $p < 0,05$).

Der Vergleich der Zellzahlen nach Abschluss der Konditionierung zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den perfundierten Polymerkonstrukten und den statischen Kontrollen.

3.5.2 Vitalitätsbestimmung

Die Vitalitätsfärbung mittels *Live/Dead assay* nach Abschluss der Konditionierungsphase zeigt bei den perfundierten Polymerkonstrukten einen dichten

Zellrasen auf der PC Membran. Nur durchschnittlich 6,5 % der abgebildeten Fläche der parenchymalen Kompartimente sind nicht mit Zellen bedeckt und zeigen kein Fluoreszenzsignal. Die Mehrzahl der abgebildeten Zellen hingegen zeigt eine deutliche grüne Fluoreszenz, das vitale Zellen mit intakter Zellmembran anzeigt. Nur wenige rot fluoreszierende Punkte deuten auf vereinzelte avitale Zellen hin (siehe Abbildung 34 - 36).

Abb. 34

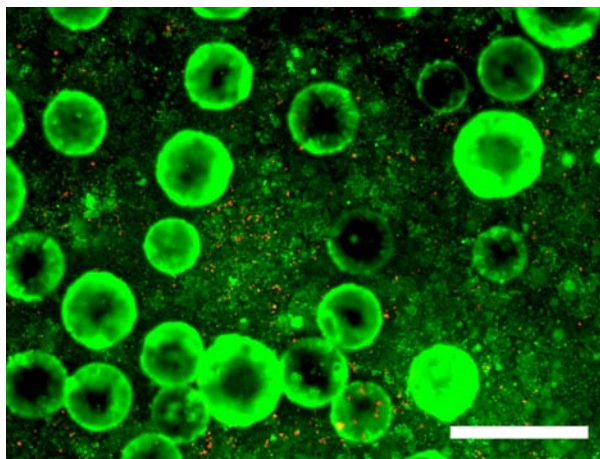


Abbildung 34 – Vitalitätsbestimmung

Vitalitätstest innerhalb eines parenchymalen Kompartimentes:
Neben vereinzelter roter Punkte zeigt sich die deutliche grüne
Fluoreszenz mehrheitlich vitaler Zellen zwischen zahlreichen Mikroträgern.
Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Abb. 35

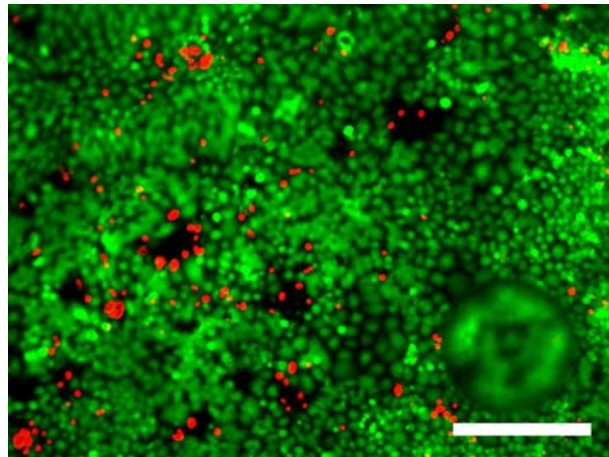


Abbildung 35 – Vitalitätsbestimmung, Detail zentral

Der Vitalitätstest zeigt einen Monolayer mehrheitlich vitaler Zellen (grün) und vereinzelte Areale mit avitalen Zellen (rot). Ein Mikroträger ist als rundliche Struktur rechts unten im Bild nur unscharf zu erkennen. Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

Abb. 36

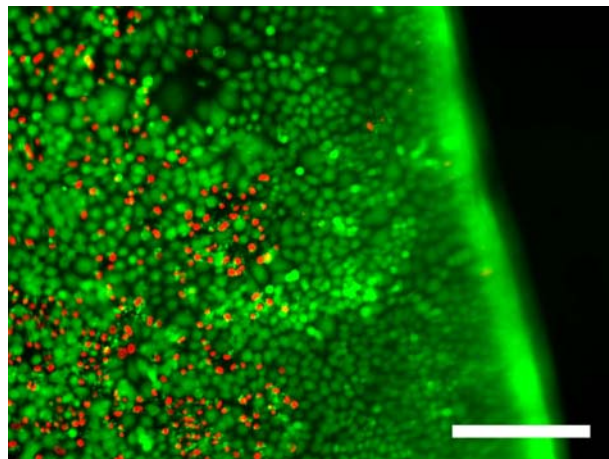


Abbildung 36 – Vitalitätsbestimmung, Detail peripher

Der Vitalitätstest zeigt einen Monolayer mehrheitlich vitaler Zellen (grün) und vereinzelte Areale mit avitalen Zellen (rot). Der dichte Zellrasen ist bis zur seitlichen Begrenzung der parenchymalern Kammer zu erkennen. Vergrößerung 100x (Maßbalken 200 µm)

Die Vitalität der Zellen beträgt auf den einzelnen Aufnahmen 92,7 % bis 99,7 % und wird im Mittel mit $96,7 \% \pm 1,9 \%$ angegeben. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der einzelnen morphometrischen Analysen zusammengefasst.

Im Gegensatz zu den perfundierten Polymersystemen erscheinen die statischen Kontrollen leer, ohne vitale oder avitale Zellen. Lediglich frei bewegliche Mikroträger und vereinzelte grüne Punkte werden abgebildet, die aufgrund der Form und des Fluoreszenzverhaltens allerdings als Artefakte gewertet werden müssen. Der gesamte Bildhintergrund zeigt eine ebenfalls artifizielle, flächige Rotfärbung, so dass eine morphometrische Analyse der statischen Kontrollen nicht vorgenommen werden kann und von einem vollständigen Verlust der besiedelten Zellen auszugehen ist (siehe Abbildung 38).

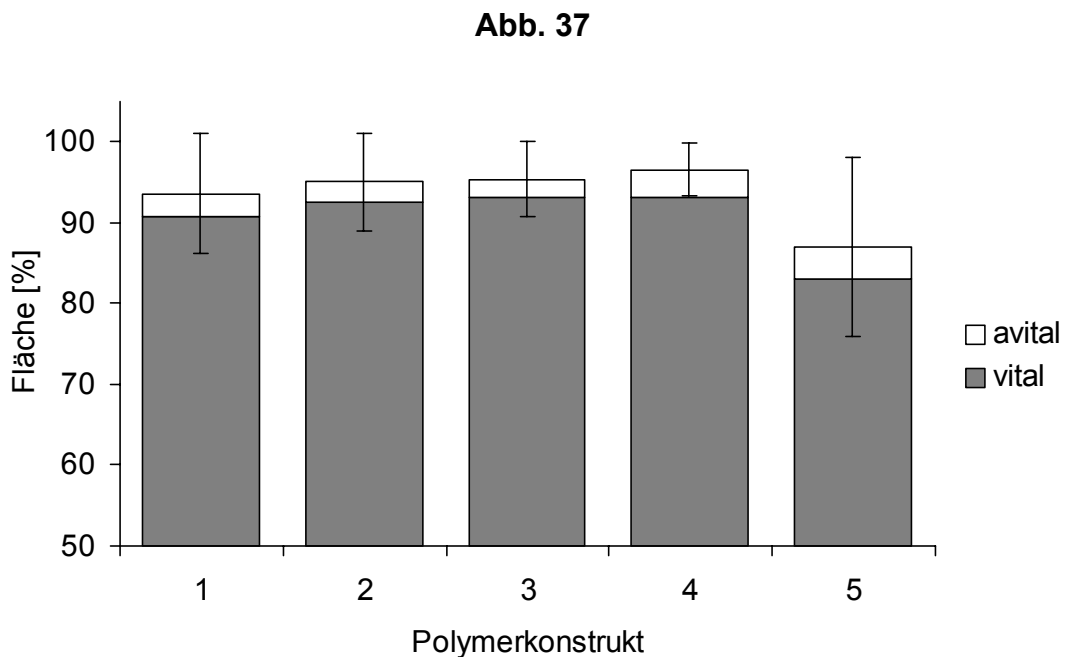


Abbildung 37 – Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung

Der Anteil vitaler und avitaler Zellen an der Gesamtfläche der abgebildeten Ausschnitte der parenchymalen Kompartimente. Die Standardabweichung der durch Zellen bedeckten Gesamtfläche innerhalb des Polymerkonstruktes.

Abb. 38

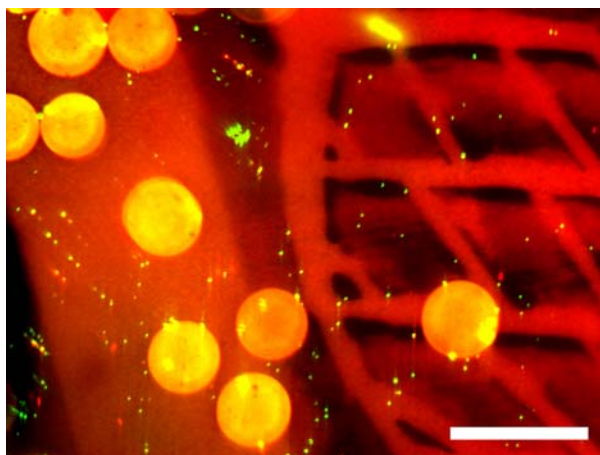


Abbildung 38 – Vitalitätsbestimmung, statische Kontrolle

Der Vitalitätstest innerhalb einer statisch kultivierten Negativkontrolle zeigt eine artifizielle flächige Rotfärbung und vereinzelt grün fluoreszierende Punkte. Die Mikroträger sind nicht fixiert und bewegen sich frei innerhalb des parenchymalen Kompartimentes.
Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

3.5.3 Funktionelle Untersuchung

Bei der funktionellen Untersuchung der kultivierten Zellen innerhalb der Polymerkonstrukte kann die Expression charakteristischer Marker für MLE-12 Zellen mittels immunhistochemischer Färbung dargestellt werden (Abbildung 39, 40). In den Aufnahmen zeigt sich im Zytoplasma, vor allem nahe des Zellkerns, ein intensiv rotes Fluoreszenzsignal. Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blau). Die Ergebnisse sind vergleichbar mit einer Färbung auf proSP-C in nativem Lungengewebe einer Maus als Positivkontrolle (siehe Abbildung 41). In der Negativkontrolle ohne primären Antikörper fehlt hingegen das rote Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 42).

Abb. 39

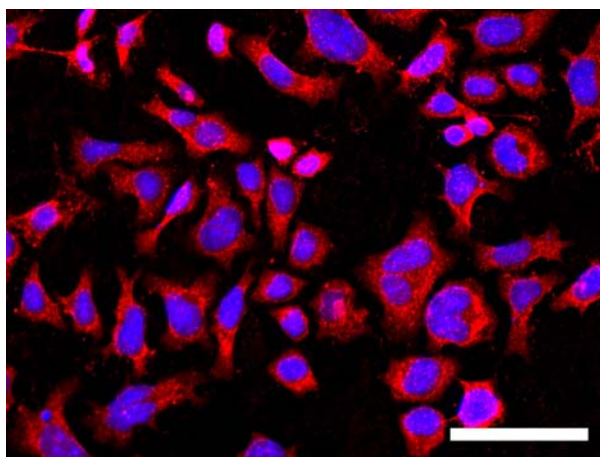


Abbildung 39 – proSP-B

Immunhistochemische Darstellung des MLE-12 Markers proSP-B (rot) in den Zellen nach Konditionierung innerhalb eines perfundierten Polymerkonstruktes. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Vergrößerung 400x (Maßbalken 50 µm)

Abb. 40

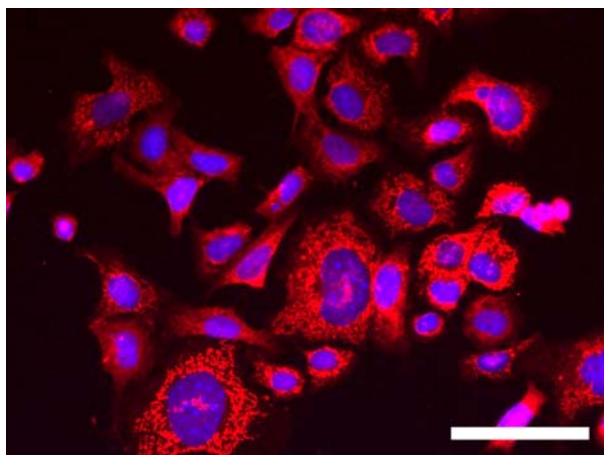


Abbildung 40 – proSP-C

Immunhistochemische Darstellung des MLE-12 Markers proSP-C (rot) in den Zellen nach Konditionierung innerhalb eines perfundierten Polymerkonstruktes. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Vergrößerung 400x (Maßbalken 50 µm)

Abb. 41

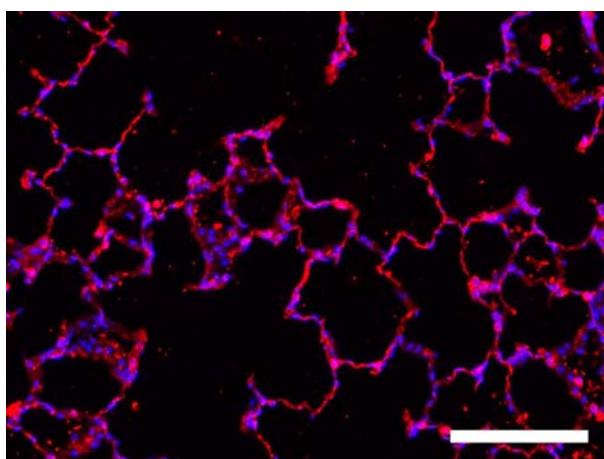
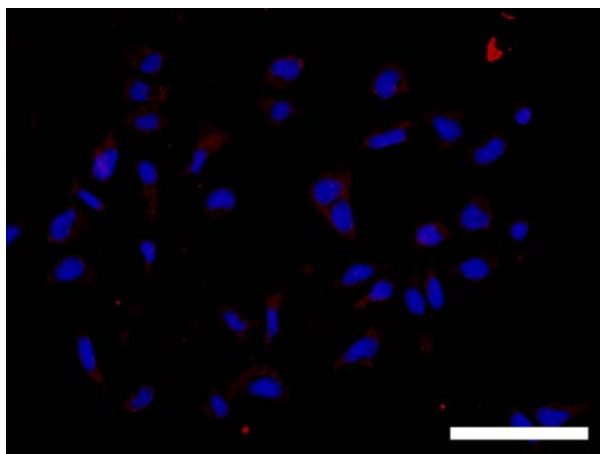


Abbildung 41 – Positivkontrolle, Immunhistochemie

Immunhistochemische Darstellung von proSP-C (rot) in einem Paraphinschnitt von nativem Lungengewebe (Maus). Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Abb. 42**Abbildung 42 – Negativkontrolle, Immunhistochemie**

Negativkontrolle für die immunhistochemische Darstellung von MLE-12 Markern (Färbung ohne primären Antikörper). Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Vergrößerung 400x (Maßbalken 50 µm)

3.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Auf den REM Bildern zeigen sich die Struktur des Polymers und die auf der Oberfläche des Polymers adhärenen Zellen. Nach 7 Tagen Konditionierung sind die Zellen innerhalb der parenchymalen Kompartimente von der Oberfläche der Mikroträger auf die PC-Membran proliferiert und bilden dort einen dichten Zellrasen. Die Mikroträger liegen einzeln oder in lockerem Verbund auf dem Boden der parenchymalen Kompartimente verteilt. Auf der Oberfläche der Mikroträger können in mehreren Schichten angeordnete Zellen dargestellt werden, die am Übergang zum PC eine breite Basis bilden (siehe Abbildung 43 – 45). Einige der Mikroträger sind während der Prozessierung der Proben für die REM von der PC-Oberfläche abgelöst worden und hinterlassen feine Mulden im Zellrasen. Auf den Bildern der Polymerquerschnitte kann die Porosität des Polymers beurteilt werden. Außerdem wird abgebildet, dass es

während der Konditionierung der Polymerkonstrukte nicht zu einer wesentlichen Proliferation der Zellen in das Innere des PC kommt. Die Zellen bilden vielmehr eine homogene Zellschicht auf der Membranoberfläche (siehe Abbildung 46).

Abb. 43

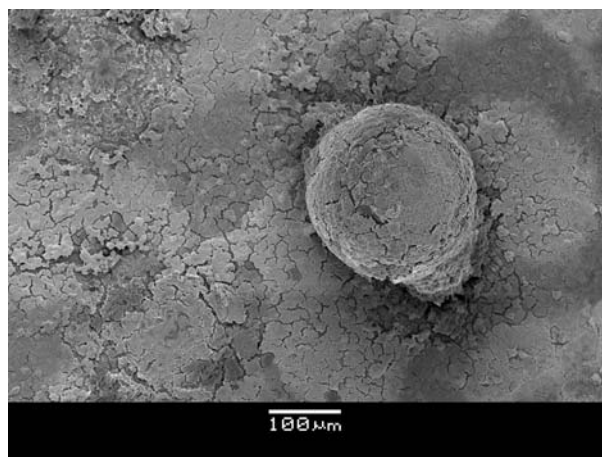


Abbildung 43 – REM, direkte Aufsicht

Mikroträger, von dessen Oberfläche sich Zellen über die PC-Membran ausgebreitet haben und den Boden des parenchymalen Kompartimentes bedecken. (Maßbalken 100 μm)

Abb. 44

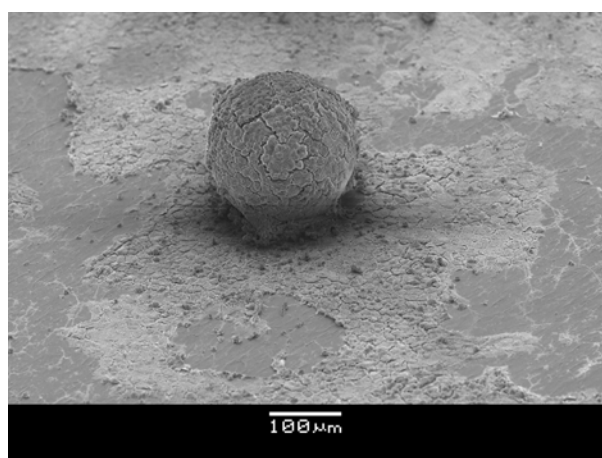


Abbildung 44 – REM, räumliche Projektion

Mikroträger in schräger Projektion. Die Zellen bedecken große Teile des Bodens im parenchymalen Kompartiment. (Maßbalken 100 μm)

Abb. 45

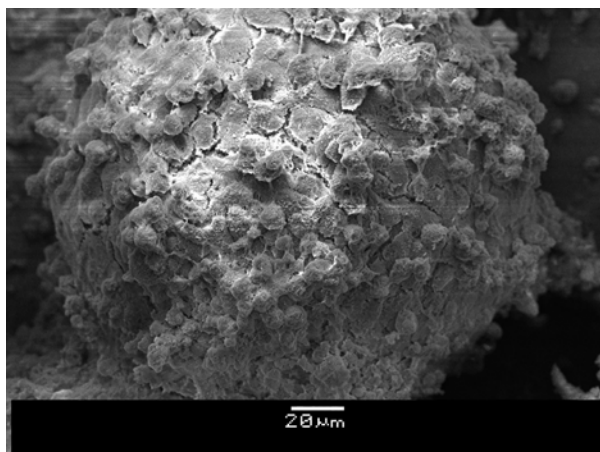


Abbildung 45 – REM, Detail

Detaillierte Darstellung eines Mikroträgers, auf dessen Oberfläche Zellen adhären wachen. (Maßbalken 20 μm)

Abb. 46

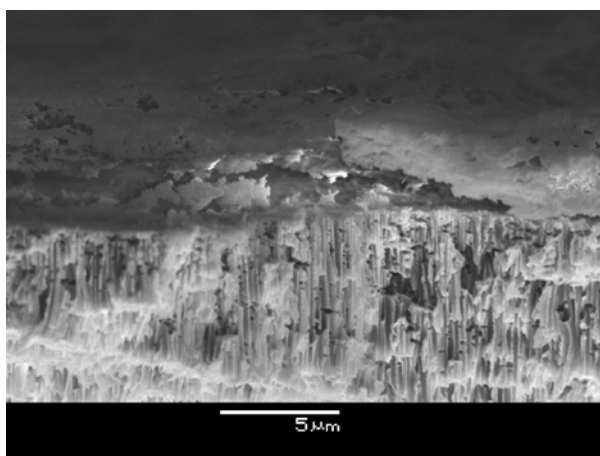


Abbildung 46 – REM, Querschnitt

Querschnitt der PC-Membran auf deren Oberfläche adhären Zellen zu erkennen sind. (Maßbalken 5 μm)

Auf den Polymerproben der statischen Kontrollen finden sich hingegen keine Mikroträger oder Zellen. Die Oberfläche des PC erscheint glatt. Mit 9000facher

Vergrößerung können die feinen Poren der PC Membran (Porengröße ca. $0,1 \mu\text{m}$) dargestellt werden. (siehe Abbildung 47)

Abb. 47

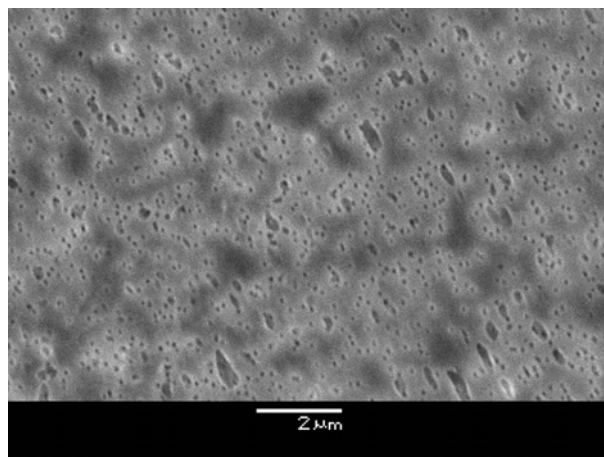


Abbildung 47 – REM, statische Kontrolle

Oberfläche der PC-Membran in einer statischen Kontrolle bei 9000facher Vergrößerung.
Die Oberfläche ist glatt, ohne Zellen und weist feine Poren auf. (Maßbalken $2 \mu\text{m}$)

3.6 Endothelialisierung der Gefäßsysteme

Während der Konditionierung der HMECs in den vaskulären Kompartimenten der Polymerkonstrukte durch kontinuierliche Perfusion der Gefäßsysteme mit Kulturmedium werden die Polymerkonstrukte im Abstand von 24 Stunden dem Inkubator entnommen und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach der Besiedelung zeigt sich zunächst eine gleichmäßige Verteilung der HMECs innerhalb der Kapillaren des vaskulären Kompartiments. Bereits wenige Stunden nach der Besiedelung kann innerhalb der Kapillaren ein Anheften der Zellen auf dem Polymer beobachtet werden. Bei Perfusion des vaskulären Kompartimentes mit 0,5 ml/h Kulturmedium kommt es zu einer gleichmäßigen Ausbreitung der besiedelten Zellen und Anordnung zu einem dichten Zellrasen innerhalb der ersten Tage nach Besiedelung. In Abbildung 48 und 49 ist der Verlauf der Proliferation der Zellen nach Besiedelung der Gefäßsysteme mit GFP markierten HMECs dargestellt.

Abb. 48

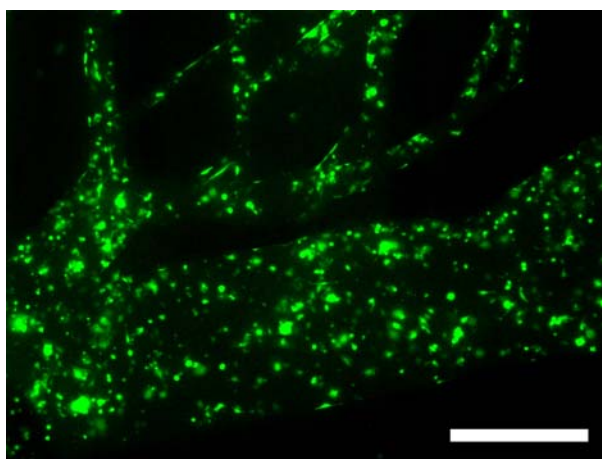
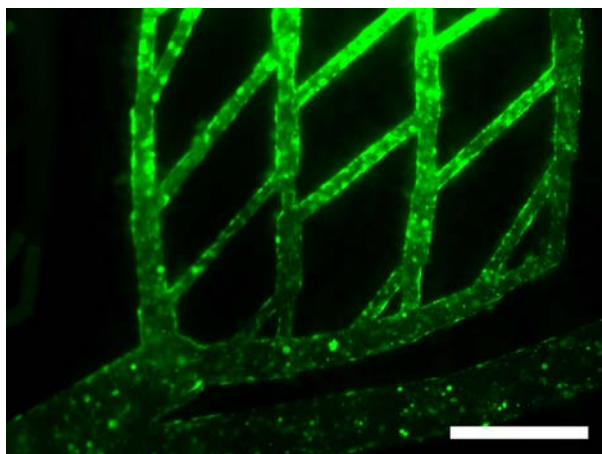


Abbildung 48 – HMECs im kapillären Gefäßsystem, t = 6

HMECs im kapillären Gefäßsystem der Polymersysteme in der Fluoreszenzmikroskopie 6 h nach Besiedelung. Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Abb. 49

**Abbildung 49 – HMECs im kapillären Gefäßsystem, t = 48**

HMECs im kapillären Gefäßsystem der Polymersysteme in der Fluoreszenzmikroskopie 48 h nach Besiedelung. Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Im weiteren Verlauf kommt es in den Versuchsserien allerdings durchgehend zum Untergang der besiedelten Zellen innerhalb der Polymerkonstrukte. Nach wenigen Tagen können nur noch vereinzelt Zellen innerhalb der Kapillaren gefunden werden. In einer bei Abbruch der Konditionierungsphase an 5. Tag durchgeführten Vitalitätsfärbung mittels *Live/Dead* assay sind nahezu keinen vitalen Zellverbände mehr vorhanden (siehe Abbildung 50).

Abb. 50

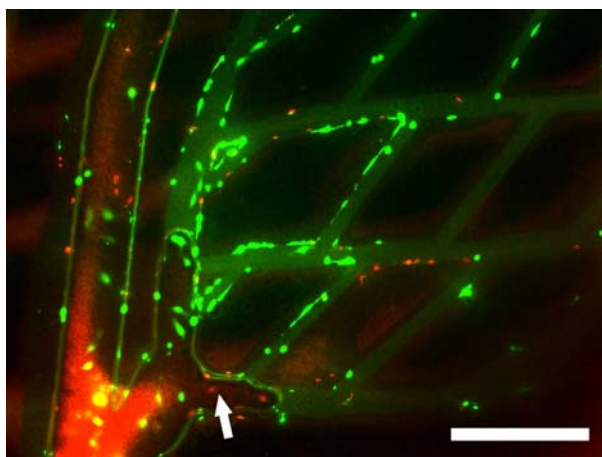


Abbildung 50 – Vitalitätsfärbung der HMECs, t = 120

Vitalitätstest innerhalb eines kapillären Gefäßsystems: grün – vital, rot – avital
 Nach 5 Tagen sind abgesehen von vereinzelt grün und rot fluoreszierenden Signalen
 nahezu keine Zellen mehr in den Kapillaren auszumachen. Der Gefäßstamm am (im Bild links)
 wird durch einen großen Luftschluck verstopft (Pfeil).
 Vergrößerung 40x (Maßbalken 500 µm)

Diese Beobachtung weicht deutlich von den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen der Endothelbesiedelung unterschiedlicher Polymere ab^{100, 104, 105, 127 - 129}. Bis zum Abschluss der Experimente im Rahmen meines Forschungsaustausches am *Laboratory of Tissue Engineering and Organ Fabrication* am *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston MA, USA* können diese Probleme nicht gelöst werden. Auf die geplante Auswertung der Kultur und Konditionierung der HMECs innerhalb des Gefäßsystems der Polymerkonstrukte mittels Vitalitätstestung und funktioneller Untersuchung muss daher verzichtet werden.

Ergebnisse weiterer Experimente zu diesem Vorhaben sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit und werden in zukünftigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Dr. Joseph P. Vacanti vorgestellt werden.