

Aus der Klinik für Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Konstruktion eines thromboresistenten Gefäßtransplantats mittels
Dezellularisierung und Rezellularisierung für gefäßchirurgische Zwecke

Construction of a thromboresistant tissue engineered vascular graft based
on de- and recellularization

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eriselda Keshi

aus Kruje, Albanien

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	ii
Abbildungsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
2 Methodik	6
3. Ergebnisse	20
3.1 Evaluation der Dezellularisierung	20
3.2 Evaluation der Rezellularisierung	20
3.3 Evaluation der Thrombogenität der rezellularisierten Gefäßtransplantate	25
3.4. Glucose und Laktat als Indikatoren für die luminale Endothelzellbedeckung	27
4. Diskussion	29
4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse	29
4.2 Interpretation der Ergebnisse	29
4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand	32
4.4 Stärken und Schwächen der Studien	34
4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung	35
5. Schlussfolgerungen	36
Literaturverzeichnis	37
Eidesstattliche Versicherung	43
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	44
Auszug aus der Journal Summary List	45
Druckexemplare der Publikationen	48
Lebenslauf	68
Komplette Publikationsliste	69
Danksagung	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenmerkmale.....	8
Tabelle 2: Antikörperübersicht.....	17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bioreaktor Kammer.....	10
Abbildung 2: Perfusionskreislauf.....	11
Abbildung 3: Vollblutperfusionskreislauf.....	14
Abbildung 4: Histologische Auswertung der dezellularisierten Gefäße.....	20
Abbildung 5: Zellkulturparameter während der Rezellularisierung	22
Abbildung 6: Scherspannung.....	23
Abbildung 7: Histologische Auswertung der rezellularisierten Gefäßtransplantate.....	24
Abbildung 8: Vollblutperfusion.....	26
Abbildung 9: Histologische Auswertung nach Vollblutperfusion.....	27
Abbildung 10: Glukose als Indikator für die Luminalabdeckung.....	28

Abkürzungsverzeichnis

BGA	Blutgasanalyseproben, <i>blood gas analysis</i>
Dacron	Dacron® Faser aus dem Polyester Polyethylenterephthalat (PET)-Bypass
PTFE	Polytetrafluorethylen-Bypass
dBCA	Dezellularisierte Gefäßtransplantate, <i>decellularized bovine carotid arteries</i>
dTEVG	Dezellularisierte Gefäßtransplantate, <i>decellularized tissue engineered vascular grafts</i>
rTEVG	Rebesiedelte Gefäßtransplantate, <i>recellularized tissue engineered vascular grafts</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EC	Reife Endothelzellen, <i>mature endothelial cells</i>
ECM	Extrazellulärer Matrix, <i>extracellular matrix</i>
EBM	<i>Endothelial basal medium</i>
EGM-2	<i>Endothelial Growth Medium</i>
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen, <i>endothelial progenitor cells</i>
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen, <i>human mesenchymal stem cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
LECC	Luminale Endothelzellbedeckung
PAA	Peroxyessigsäure, <i>peracetic acid</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
SDT	Standarddezellularisierungsbehandlung, <i>Standard decellularization treatment</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth Medium</i>
VBP	Vollblutperfusion
WSS	Scherspannung, <i>wall shear stress</i>
PRP	Plättchenreiches Plasma, <i>Platelet Rich Plasma</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser, <i>distilled water</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth Medium with Catabolite Repression</i>

Zusammenfassung

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit handelt es sich um eine durch Atherosklerose bedingte Stenose oder einen kompletten Verschluss der peripheren Arterien. In den letzten Stadien der Krankheit müssen interventionelle oder sogar offenchirurgische therapeutische Eingriffe durchgeführt werden. Im Falle der Notwendigkeit einer Bypass-Operation werden aus Gründen der Biokompatibilität und Materialeigenschaften idealerweise autologe Venen verwendet. Diese Gefäße stehen jedoch in mehr als 20 % der Fälle nicht zur Verfügung und machen die Herstellung personalisierter biologischer Gefäßtransplantate als möglichen Ersatz erstrebenswert. Die Rebesiedelung von dezellularisierten bovinen Karotiden könnte die Grundlage für ein implantierbares Gefäßtransplantat darstellen. Wesentlich für den Erfolg eines solchen Verfahrens und den Einsatz als Gefäßersatz sind dabei jedoch eine physiologische Luminalbedeckung des Gefäßtransplantats und die *ex vivo* Thromboresistenz.

In dieser Studie wurden dezellularisierte bovine Karotiden mit humanen endothelialen Vorläuferzellen und mit aus der Nabelschnurvene isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen rezellularisiert. Die luminale Endothelzellbedeckung (LECC) wurde anhand der Glukose- und Laktatwerte im Zellüberstand kalkuliert. Anschließend wurden rezellularisierte Gefäßtransplantate mit einer LECC >50 % und dezellularisierte Gefäßtransplantate *ex vivo* zwei Stunden mit humanem Vollblut perfundiert. Unter anderem wurden die Hämolysewerte und die Thrombozytenzahl stündlich ausgewertet, gefolgt von der histologischen Auswertung.

Die Vollblutperfusion der dezellularisierten Gefäßtransplantate verursachte einen statistisch signifikanten Thrombozytenverbrauch. Der Thrombozytenverbrauch der mit Vollblut perfundierten rebesiedelten Gefäßtransplantate war statistisch insignifikant ($p = 0,7284$). Dieses Ergebnis wurde durch die makroskopische Auswertung und durch die histologische Charakterisierung bestätigt, welche ergab, dass die rezellularisierten Transplantate keine CD41-positiven Thrombozyten aufwiesen.

Diese Arbeit liefert somit den Nachweis für einen positiven Effekt der Oberflächenmodifikation durch Rebesiedelung von Gefäßtransplantaten auf deren Thromboresistenz in einem *ex vivo* Vollblutperfusionssystem.

Abstract

Peripheral arterial disease is stenosis or complete occlusion of the peripheral arteries due to atherosclerosis. In case of the need for bypass surgery, autologous veins are ideally used for reasons of biocompatibility and material properties. However, these vessels are not available in more than 20 % of cases, making the production of personalized biological vascular grafts as a possible substitute desirable. The repopulation of decellularized bovine carotids could provide the basis for an implantable vascular graft. We present a method to precondition vascular grafts using biological scaffolds and test thromboresistance of seeded grafts in an *ex vivo* setup using human whole blood. Moreover, we evaluate a non-invasive method to indicate luminal coverage (LECC) of the grafts.

A 48h-protocol was established for static seeding with vascular cells, which was followed by dynamic culture over 14 (n=5) and 10 (n=9) days. Glucose and lactate were implemented as non-invasive indicators of LECC. Thromboresistance was tested in an *ex vivo* long-term whole blood perfusion setup. Immediately after seeding, recellularized grafts with estimated LECC >50 % were perfused for 2 hours. Perfusion of acellular scaffolds was used as a comparison. Hourly hemolysis and complete blood count evaluation was performed. Histological and immunohistochemical analysis followed.

Whole blood perfusion of the decellularized vascular grafts caused a statistically significant platelet consumption. Platelet consumption of the repopulated vascular grafts perfused with whole blood was statistically insignificant ($p = 0.7284$). This result was confirmed by macroscopic evaluation and by histologic characterization, which revealed that the recellularized grafts had no CD41-positive platelets on the luminal surface.

This study confirmed *ex vivo* thromboresistance of vascular grafts preconditioned with human EPC and addressed multiple bottlenecks of *ex vivo* dynamic whole blood perfusion experimental setups by exposing engineered vascular grafts to human whole blood recirculating at high flow rates over two hours.

1 Einleitung

Die Atherosklerose ist eine der häufigsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen und häufig ursächlich für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) [2,3]. Die kritische Ischämie der Extremitäten ist eine der schwerwiegendsten Stadien dieser Erkrankung. Um eine Amputation zu vermeiden, besteht neben der interventionellen endovaskulären Therapie, die Möglichkeit einer operativen Therapie, wie z. B. Thrombendarteriektomie peripherer Gefäße oder eine Überbrückung der Stenose mittels Bypass-Operation [4] durch ein anderswo gewonnen Gefäß, beispielsweise durch einen autologen Venen-Bypass, z.B. aus der Vena saphena magna oder durch eine Gefäßprothese. Diese Gefäße sind jedoch bei mehr als 20 % der Patienten nicht verfügbar [1, 5, 6]. Als Alternative dazu wird alloplastisches Bypassmaterial, bestehend aus Polyester Polyethylenterephthalat (PET, Dacron®-Bypass) oder Polytetrafluorethylen (PTFE) verwendet [7]. Diese alloplastischen Bypassmaterialien sind jedoch körperfremde, künstliche Materialien. Der Behandlungserfolg mit diesen Materialien wird durch Komplikationen, wie thrombotischem Verschluss, hohe Infektionsraten, biomechanische Fehlanpassung, Intimahyperplasie, oder Verkalkung beeinträchtigt [1, 8-10]. Als Alternative können durch De- und Rezellularisierung von Geweben tierischen Ursprungs biologische funktionelle personalisierte Gewebe gewonnen werden. Diese bestehen aus einer durch Dezellularisierung gewonnen natürlichen, wenig immunogenen Extrazellulärmatrix (*extracellular matrix*, ECM) sowie aus lebenden, patientenspezifischen reifen Zellen oder Vorläuferzellen (Zellisolierung und Rezellularisierung der ECM), die im Falle einer Implantation von dem Empfänger nicht als fremd erkannt werden [11].

Wesentliche Limitation beim *Tissue Engineering* von Gefäßtransplantaten ist bisher die vollständige Rekonstruktion einer funktionsfähigen Endothelschicht, welche nach Kontakt mit Vollblut die Thrombusbildung mit konsekutivem akutem Verschluss oder aber eine fortschreitende Intimahyperplasie zur Folge hat [1, 12, 13]. Als Alternative zur Verwendung von reifen Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) humanen oder xenogenen Ursprungs oder Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC; *human umbilical vein endothelial cells*) haben in den letzten Jahren endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPC) zunehmend an Bedeutung gewonnen [14]. Diese Zellen können durch eine routinemäßige Venenpunktion aus dem peripheren Blut von Patienten mit multiplen Vorerkrankungen isoliert werden [15, 16]. Diese Charakteristik ist

für eine spätere potenzielle Konstruktion von personalisierten Gefäßtransplantaten von Bedeutung, da die Mehrzahl der Patienten mit pAVK auch an anderen chronischen systemischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Typ II, oder arterieller Hypertonie leidet. Zudem zeigen EPC Qualitäten von reifen Endothelzellen, wenn sie physiologischen Scherbelastungen ausgesetzt sind [15, 16].

Die Thrombogenität der alloplastischen Bypassmaterialien ist auf die Auslösung von entzündlichen und thrombotischen Reaktionen durch den Kontakt von Blut mit künstlichen Biomaterialien oder mit exponierter extrazellulärer Matrix zurückzuführen [17]. Studien konnten belegen, dass die nach Rezellularisierung der Gefäßtransplantate wiederhergestellte Endothelschicht die Thrombogenität erheblich vermindern kann [18,19]. Basierend auf diesen Daten, scheint die *ex vivo* Überprüfung der Thromboresistenz von mit Methoden des *Tissue Engineering* hergestellten Gefäßtransplantaten unverzichtbar, nicht nur um eine Thrombosierung des Transplantats zu vermeiden, sondern auch um den Erfolg der Rezellularisierung zu überprüfen. Trotz der bekannten Relevanz ist die Überprüfung der Thromboresistenz ein technisch schwieriges und bis dato vernachlässigtes Gebiet [1, 19, 20, 21]. Dies ist insbesondere durch die Notwendigkeit eines dynamischen Vollblutperfusionssystems zur Simulation physiologischer Bedingungen begründet: bisher konnten nur bei wenigen Studien Gefäße unter solchen Bedingungen evaluiert werden [19, 21]. Es gibt drei Hauptanforderungen, die ein optimaler Versuchsaufbau für die Vollblutperfusion erfüllen muss [1, 19]:

1. Die Strömung und die applizierte Scherstressbelastung müssen die physiologischen Bedingungen und die Transportdynamik, welche während der Thrombusbildung im Körper entsteht, nachahmen ohne eine Ablösung der Endothelzellen von der thrombogenen luminalen Oberfläche zu verursachen.
2. Die Quelle des verwendeten Bluts und die optimale Menge des Antikoagulans muss festgelegt werden. Die Antikoagulation muss niedrig genug sein, damit die Thrombusbildung nicht beeinträchtigt wird, aber hoch genug, um eine vorzeitige Thrombusbildung zu verhindern, da beide Ereignisse die Ergebnisse verfälschen können.
3. Besonders herausfordernd ist es, ein Gleichgewicht zwischen der Oberfläche des mit Endothelzellen besiedelten Gefäßes und der thrombogenen Oberfläche der für das Perfusionssystem unverzichtbaren Verbindungs- und Pumpenschläuche sowie des Reservoirs herzustellen.

Häufig wird auf dynamische Vollblutperfusionssysteme verzichtet und Gefäßprothesen werden unter statischen Bedingungen diversen Blutbestandteilen, wie z.B. Thrombozyten oder plättchenreichem Plasma (*PRP, platelet rich plasma*), ausgesetzt [1].

In der vorliegenden Studie wurde die Rezellularisierung von dezellularisierten bovinen Karotiden mit humanen EPC und MSC durchgeführt. Dabei wurden zwei Rezellularisierungsprotokolle miteinander verglichen. Des Weiteren wurden tägliche Messungen bestimmter Zellkulturparameter als Indikatoren der Stabilität der Zellkultur und der luminalen Endothelzellbedeckung (*luminal endothelial cell coverage, LECC*), durchgeführt. Anschließend erfolgte die Perfusion der dezellularisierten und rezellularisierten Gefäßtransplantate mit humanem Vollblut in einem *ex vivo* dynamischen Perfusionssystem. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden die Hämolyse- und Blutbildparameter miteinander verglichen.

2 Methodik

2.1 Ethikvotum

Alle Methoden wurden in Übereinstimmung mit den einschlägigen Richtlinien und Vorschriften durchgeführt. Für die Rebesiedelung der dezellularisierten Gefäßtransplantate wurden humane EPC verwendet. Die Genehmigung zur Isolierung dieser Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten, die in der Chirurgischen Klinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden und sicher einer venösen Blutentnahme zu diagnostischen Zwecken unterziehen mussten, wurde von der lokalen Ethikkommission der Charité erteilt (EA2/123/10). Die Zustimmung aller an dieser Studie teilnehmenden Patienten lag vor der Venenpunktion vor [1].

Es wurde humanes Vollblut für die Vollblutperusionsversuche verwendet. Das Blut wurde sechs gesunden, freiwilligen Probanden im Alter zwischen 18 und 65 Jahren, bei denen weder eine Immunschwäche (primäre und sekundäre Immundefekte), noch eine Erbkrankheit oder chronische Organfunktionsstörung bekannt war, entnommen. Sowohl die Zustimmung der örtlichen Ethikkommission der Charité (EA1/073/20) als auch das Einverständnis der Spender lag vor [1].

2.2 Entnahme der bovinen Karotiden

Die in dieser Studie verwendeten Rinderkarotiden wurden im Rahmen der Schlachtung von Kühen in einem örtlichen Schlachthof entnommen. Um die frische Entnahme der Arterien sicherzustellen, wurde vorab ein Termin mit dem Schlachthof vereinbart. Am Tag der Entnahme wurden die Tiere durch die Mitarbeiter des Schlachthofs zunächst durch Blutentzug getötet und halbiert. Zum Zeitpunkt der Entnahme war der Hals der Tiere und die Karotiden bereits auf beiden Seiten eröffnet. Innerhalb kurzer Zeit wurden die Arterien zusammen mit dem umgebenden Gewebe sorgfältig herauspräpariert. Anschließend wurden die Gefäße in kalter PBS Lösung (PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) gespült, um etwaige Blutreste zu entfernen und auf Eis in die Labore der Experimentellen Chirurgie am Campus Virchow-Klinikum transportiert [1]. Im Labor wurde sofort das überschüssige Gewebe entfernt und die Arterien in 6-10 cm lange Segmente disseziert. Insgesamt wurden circa 100 Karotiden entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Gefäße hatten einen Durchmesser von 0,5 bis 0,7 cm [1].

2.3 Dezellularisierungsprotokoll

Mehrere Gefäße wurden parallel dezellularisiert. Hierfür wurde das von *Seiffert et al.* in der eigenen Arbeitsgruppe etablierte und bereits publizierte Dezellularisierungsprotokoll verwendet (Standard-Dezellularisierungsbehandlung, *standard decellularization treatment, SDT*) [1, 16]. Das Protokoll besteht aus drei Hauptphasen, die jeweils in verschiedene Schritte unterteilt werden. Die erste Phase umfasst die Gefrierentwässerung der bovinen Karotiden (*freeze-thaw treatment*). Nach einer Mindestinkubationszeit von 24 Stunden bei -80°C wurden die Gefäße zum Auftauen bei 5°C aufbewahrt. In der zweiten Phase erfolgte die osmotische Behandlung der Gefäße (*osmotic treatment*). Hierfür wurden die Gefäße in destilliertes Wasser (ddH₂O) gelegt und über 48 Stunden auf einem elliptischen Rohrwalzenmischer (*elliptical tube roller, RM5, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland*) inkubiert. Die anschließende dritte Phase des Protokolls bestand aus einer multizyklischen Behandlung mit Detergenzien und darauffolgender enzymatischer Behandlung. Dabei wurden die Gefäße in drei Zyklen von jeweils 24 Stunden einer enzymatischen Verdauung unterzogen. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten. Zunächst wurden die Gefäße über zwei Stunden mit 0,05 % Trypsin in 0,02 % EDTA in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf dem Rollator bei 4°C behandelt. Im Anschluss wurden die Gefäße zur Agitation über vier Stunden in 0,1 % Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Hiernach erfolgte die Verdauung mit 8 mg/ml DNase-I (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) über zwei Stunden bei 37°C. Nach Abschluss des Verdauungsprozesses wurden die Gefäße über Nacht in ddH₂O bei 4°C auf dem elliptischen Rohrwalzenmischer inkubiert. Die dezellularisierten Gefäßtransplantate (*decellularized bovine carotid arteries, dBCA*) wurden bis zur weiteren Verwendung in sterilem PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) bei 4°C gelagert.

Vor der Rezellularisierung erfolgte die Sterilisation der dBCA in 0,02 % Peroxyessigsäure (*peracetic acid, PAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) und 4 %igem Ethanol (EtOH) für sechs Stunden bei 4°C. Im Anschluss wurden die dBCA in PBS bis zum Erreichen eines physiologischen pH-Werts (7,3 - 7,4) gewaschen und in frischem Zellmedium über Nacht inkubiert [1].

2.4 Zellisolierung, Expansion und Kultur

Für die Rezellularisierung der dBCA wurden humane endotheliale Vorläuferzellen (humane EPC, hEPC) sowie aus der Nabelschnur isolierte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) verwendet.

hEPC:

Die hEPC wurden von insgesamt acht Patienten (50 % weiblich), mit einem Durchschnittsalter von $50 \pm 13,5$ Jahre isoliert. Bei 50 % der Patienten wurde eine bösartige Erkrankung, bei 25 % eine Autoimmunerkrankung und bei weiteren 25 % eine sonstige Erkrankung diagnostiziert (**Tab. 1**) [1].

Tabelle 1: Detaillierte Merkmale der Patienten, von denen eine hEPC-Isolierung durchgeführt wurde. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1]

Merkmale der (n=8) Patient(inn)en	
Alter (Mittelwert/Spannweite)	50/31-69
Geschlecht	
Männlich	4 (50 %)
Weiblich	4 (50 %)
Grunderkrankungen	
Malignität	4 (50 %)
Autoimmunerkrankung	2 (25 %)
Sonstige	2 (25 %)

Für die Isolierung der hEPC wurde ebenfalls ein in der Arbeit von *Seiffert et al.* publiziertes Protokoll verwendet [1, 16]. Zusammengefasst wurden 20 ml peripheres Blut von Patienten der Chirurgischen Klinik entnommen und ins Labor transportiert. Die Blutproben wurden heparinisiert und für jeden Patienten separat behandelt. Die Proben wurden einer Biocoll (Biochrom) Dichtegradientenzentrifugation ausgesetzt. Der dadurch gewonnene Überstand wurde auf Zellkulturflaschen verteilt, die vorab mit einer Fibronectin-Gelatine Mischung beschichtet wurden. Die Zellen wurden zunächst bei 37°C und mit 5 % CO₂ mit EGM-2 (Endothelial Growth Medium) auf Zellkulturplatten mit einer 0,02 % Gelatinebeschichtung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kultiviert. Das EGM-2 Medium bestand aus EBM-2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland), ergänzt mit 20 % fötalem Rinderserum (FBS; Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), SupplementMix

(PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland), 500 U/ml Penicillin und 500 µg/ml Streptomycin (beide Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland). Nach vier Tagen wurden die Zellkulturen zum ersten Mal mit PBS gewaschen. Zudem wurde neues Medium hinzugegeben, welches jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurden sie von den Zellkulturflaschen trypsinisiert, in einer Mischung bestehend aus Nährmedium und Dimethyl sulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -167°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zwei Wochen vor einem Rezellularisierungsversuch wurden die Zellen aufgetaut, in EGM-2 resuspendiert, in Zellkulturflaschen verteilt und in bis zu acht Zellkulturflaschen mit einer Konfluenz von 80-90 % expandiert und kultiviert. Die Zellen wurden in den Passagen 3 bis 6 verwendet.

hMSC:

hMSC wurden von ATCC (*human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*, PCS-400-030, ATCC / LGC Standards; Wesel, Deutschland) erworben. Die Zellen wurden zunächst expandiert, indem sie in Dulbecco's Medium (DMEM, 1 g/L Glukose, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 500 U/ml Penicillin, 500 µg/ml Streptomycin (beide Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 1 % Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) resuspendiert und in Zellkulturflaschen verteilt wurden. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreichten, wurden sie trypsinisiert, in einer Mischung bestehend aus Nährmedium und Dimethyl sulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -167°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zwei Wochen vor einem Rezellularisierungsversuch wurden die Zellen aufgetaut, in DMEM Medium resuspendiert, in Zellkulturflaschen verteilt und in bis zu vier Zellkulturflaschen mit einer Konfluenz von 80-90 % expandiert und kultiviert. Die Zellen wurden in den Passagen 3 bis 7 verwendet [1].

2.5 Entwicklung einer geeigneten Bioreaktor-Kammer und eines Perfusionskreislaufs

Für die Rebesiedelung und die dynamische Kultivierung der dBCA wurden eine Bioreaktor-Kammer und ein Perfusionskreislauf entwickelt, welche die notwendigen sterilen und physiologischen Bedingungen für die Experimente bereitstellten [1].

2.5.1 Entwicklung einer Bioreaktor-Kammer für die Rebesiedelung der dBCA

Die Bioreaktor-Kammer (**Abb. 1 A,B**) bestand aus einem speziell angefertigten zylindrischen Bioreaktor (a), in dem der Teil, in welchem das Gefäßtransplantat (c) eingebracht und an den Perfusionskreislauf angeschlossen wurde (b), zwischen den Haupteinlässen des Bioreaktors platziert wurde. Dieser Teil wurde über einen Verbindungsschlauch mit zwei Dreiwegehähnen verbunden (d). Das Protokoll für die Zellgabe wird nachfolgend detailliert beschrieben.

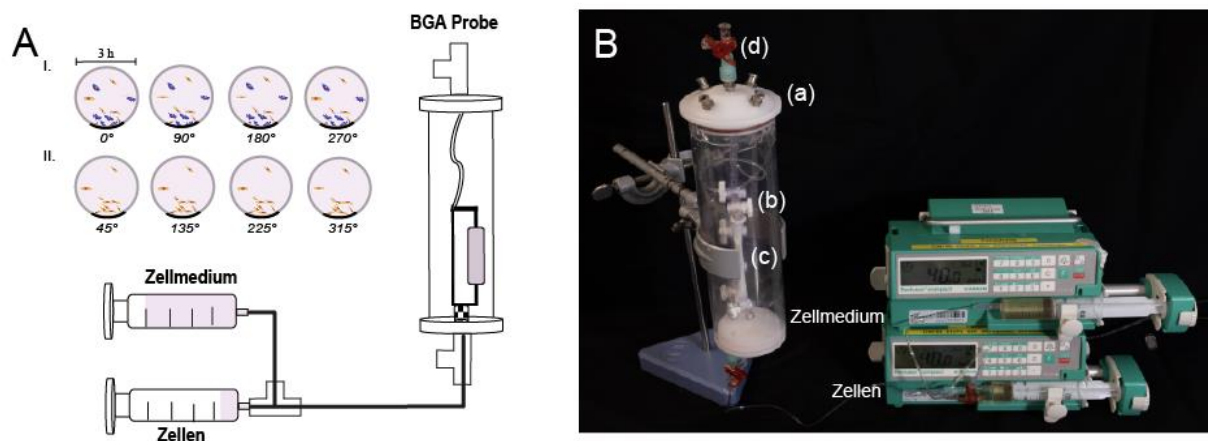


Abbildung 1: Bioreaktor Kammer. Schemazeichnung (A) des Aufbaus (B): Für die Zellgabe und die Rebesiedelung wurde das dBCA (B,c) in den gefäßhaltigen Teil (B,b) im Inneren des Bioreaktors (a) senkrecht positioniert, der zur Entfernung von Luftblasen vertikal gedreht wurde. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

2.5.2 Entwicklung eines Perfusionskreislaufs für die dynamische Kultivierung

Für die dynamische Kultivierung der rezellularisierten Gefäßtransplantate adaptierten wir einen von unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Perfusionskreislauf, der für die Rezellularisierung von dezellularisierten Rattenlebern verwendet wurde [1, 22]. Hierbei wurde die Bioreaktor-Kammer an einen Perfusionskreislauf angeschlossen. Der Kreislauf bestand aus einem Reservoir (e), einer peristaltischen Pumpe (f), einem Oxygenator (g) und einer Blasenfalle (h). Alle Bestandteile des Kreislaufs wurden miteinander durch Verbindungsschläuche verbunden. Bevor die Bioreaktor-Kammer angeschlossen wurde, wurde das Reservoir zunächst mit Medium befüllt, um mithilfe der Pumpe den gesamten Kreislauf zu entlüften. Die roten Pfeile zeigen die Perfusionsrichtung an. Aus den vor der Bioreaktor-Kammer und nach dem Reservoir stehenden Dreiwegehähnen wurde täglich

die Entnahme der Blutgasanalyseproben (*blood gas analysis*, BGA) und der Mediumwechsel durchgeführt

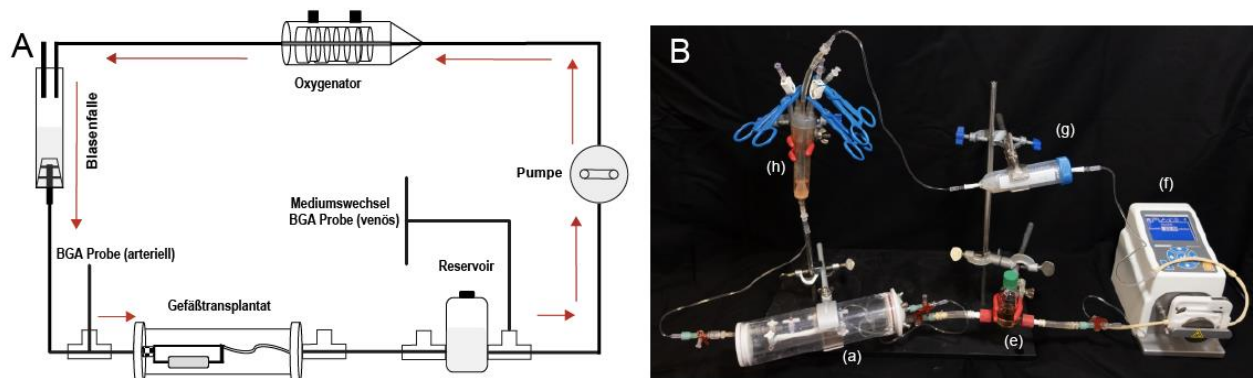


Abbildung 2: Schemazeichnung (A) des Aufbaus des Perfusionssystems (B): Nach der Zellgabe wurde die das Gefäß enthaltende Bioreaktorkammer (B,a) an den Perfusionsschleife angeschlossen, welcher aus dem mit Medium gefüllten Reservoir (B,e), der Peristaltikpumpe (B,f), dem Oxygenator (g) und der Blasenfalle (B,h) bestand. Die roten Pfeile zeigen die Perfluationsrichtung. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

2.5.3 Strömungsdynamik

Im Rahmen der dynamischen Kultivierung der statisch rebesiedelten dBCA ist die Strömungsdynamik und die Berechnung der applizierten Scherspannung (*wall shear stress*, WSS) relevant. Daher wurde die Scherspannung, welche auf die Wand der Gefäßtransplantate während der dynamischen Kultivierung wirkte, berechnet. Die Untersuchungen des Strömungsfelds wurden mit der kommerziellen CFD-Software STAR-CCM+ (CD-Adapco, Melville, New York), die einen Finite-Volumen-Ansatz verwendet, durchgeführt [1]. Es wurde ein Gefäß mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Länge von 60 mm simuliert. Um sicherzustellen, dass die Strömung vollständig entwickelt war, wurde vor dem Gefäß ein Anströmbereich hinzugefügt. Für das Medium wurde eine Viskosität von 0,6913 mPa*s nach *Huber et al.* angenommen [1, 23]. Für die scherabhängige Viskosität wurde das Carreau-Yasuda-Modell mit den von *Abraham et al.* beschriebenen Parametern verwendet [1, 24]. Die Reynoldszahl, das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften, wurde für die Nährlösung auf 61 und für Vollblut auf 3,5 geschätzt. Es wurde eine laminare, stetige Strömung mit konstanter Dichte angenommen.

2.6 Rebesiedelung und Evaluation der luminalen Endothelzellbedeckung

Im Kontext der statischen Rebesiedelung der dBCA und die dynamische Kultivierung ist hervorzuheben, dass – auch wenn in der von *Seiffert et al.* publizierten Studie die

Besiedlung von dezellularisierten Gefäßfragmenten mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen (hEPC und hMSC) etabliert wurde – sich die Rebesiedelung von ganzen tubulären dBCA als herausfordernd zeigte. Die Etablierung des unten aufgeführten Protokolls ist das Ergebnis mehrerer Versuche, in denen verschiedene Rebesiedelungs- und Perfusionsmethoden sowie Kultivierungszeiten untersucht wurden.

2.6.1 Zellgabe und Rebesiedelung der dBCA

Für die Zellgabe und Rebesiedelung der dBCA wurde ein Protokoll für eine 48-stündige Kulturphase etabliert [1]. Es besteht aus acht Zyklen von jeweils drei Stunden und einer statischen Übernachtinkubation: Zunächst wurde der in Abb.1 B aufgeführte Aufbau unter der sterilen Zellkulturbank zusammengesetzt. Das dBCA wurde an den gefäßhaltigen Teil des Bioreaktors angeschlossen und mit Nährmedium (EGM-2 : DMEM Mischung in einem 1:1 Verhältnis) befüllt. Das ganze System wurde an einen Ständer angeschlossen und in einem 37°C Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) platziert. An den obersten Dreiwegehahn wurde ein Luftfilter und anschließend die Sauerstoffzufuhr (95 % O₂, 5 % CO₂) angeschlossen, um die Kammer und das Zellmedium vor der Zellgabe zu oxygenieren.

Während der ersten vier Zyklen wurden hEPC und hMSC in einer Lösung appliziert. Zunächst wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: sie wurden mit PBS gewaschen, fünf Minuten bei 37°C in Trypsin/EDTA Lösung inkubiert, danach fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert und in den jeweiligen Medien in 1 ml resuspendiert. Insgesamt wurden $(22,51 \pm 19,75) \times 10^6$ EPC und $(12,07 \pm 9,86) \times 10^6$ MSC gegeben. Die hEPC und die hMSC wurden in einer 20 ml Spritze im Verhältnis von 2:1 aufgenommen. Separat wurde eine Spritze mit EGM-2 und DMEM im Verhältnis 1:1 vorbereitet. Abschließend erfolgte die Zellgabe zur Rebesiedelung der dBCA unter der Zellkulturbank mithilfe einer Spritzenpumpe mit einer niedrigen Flussrate von 40 ml/h, um eine Ablösung der vorher gegebenen Zellen zu vermeiden. Die Bioreaktor-Kammer wurde anschließend horizontal in einen 37°C warmen Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) gestellt, sodass sich die Zellen 3 Stunden lang ansiedeln konnten. Die Kammer wurde an die Sauerstoffzufuhr (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid; DASGIP MX4/4, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) angeschlossen [1].

Dieses Prozedere wurde insgesamt 8-mal durchgeführt, allerdings wurden in den letzten vier Zyklen ausschließlich hEPC verwendet (**Abb. 1 A**). Die Bioreaktor-Kammer wurde in jedem Zyklus um 45° (Längsachse) gedreht, um eine Zellbesiedlung des gesamten dBCA

mithilfe der Schwerkraft zu erreichen. Nach jedem Zyklus wurden 0,5 ml Zellkulturmedium aus dem Bioreaktor für die BGA entnommen, um die Lebensfähigkeit/Vermehrung der Zellen zu überwachen. Die Parameter wurden mit dem Standard-Analysegerät ABL 800 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) ausgewertet. Ein repräsentativer Versuch wurde nach der 24-stündigen Rebesiedelung abgebrochen (n=1), um entsprechende histologische und immunhistologische Analysen durchzuführen [1].

2.6.2 Dynamische Kultivierung der rebesiedelten Gefäßtransplantate (rTEVG)

Das Reservoir wurde mit 50 ml Zellkulturmedium befüllt (EGM-2 und DMEM im Verhältnis 1:1) und das Perfusionssystem entlüftet. Nach dem achten Rebesiedelungszyklus wurde die Bioreaktor-Kammer an das Perfusionssystem angeschlossen (**Abb. 2 A, B**). Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit einer langsamen Flussrate von 0,3 ml/min konditioniert, um es den Zellen zu ermöglichen sich an der luminalen Oberfläche der dBCA anzusiedeln, bevor sie einer höheren Flussrate ausgesetzt wurden.

Am Folgetag wurde die Perfusion mit einer Flussrate von 0,6 ml/min gestartet, die über 10 (n=8) bzw. 14 (n=5) Tage schrittweise auf 6 ml/min, respektive 8 ml/min erhöht wurde. Die hEPC wurden innerhalb dieser Zeit einer zunehmenden subphysiologischen Scherbelastung ausgesetzt, wodurch sie eine optimale Versorgung mit Nährstoffen erhielten. Das Zellmedium wurde täglich ausgetauscht, die Parameter der Zellviabilität und -proliferation überprüft und das Transplantat um 45° (Längsachse) gedreht. Insgesamt wurden 13 Experimente zur Rezellularisierung durchgeführt. Davon wurden fünf über 14 Tage dynamisch kultiviert. Da die ersten Untersuchungen der Zellkulturparameter (Glucose und Laktat) und der luminalen Endothelzellbedeckung eine Überlegenheit der 10-tägigen Perfusion gegenüber der 14-tägigen Perfusion ergaben, wurden alle weiteren rTEVG (n=8) über 10 Tage dynamisch kultiviert.

2.6.3 Evaluation der luminalen Endothelzellbedeckung der rTEVG

Am Ende der dynamischen Kultivierungsphase wurde die luminalen Endothelzellbedeckung (*luminal endothelial cell coverage*, LECC) aller rTEVG berechnet. Mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbte Paraffinschnitte aus dem linken, mittleren und rechten Teil des Transplantats wurden dafür ausgewertet. Die LECC wurde prozentual angegeben. Der Mittelwert der prozentualen LECC aller drei Abschnitte, sowie der Mittelwert der berechneten Prozentsätze aus der von zwei Personen unabhängig durchgeführten histologischen Befundung, wurde als endgültiger LECC-Wert verwendet.

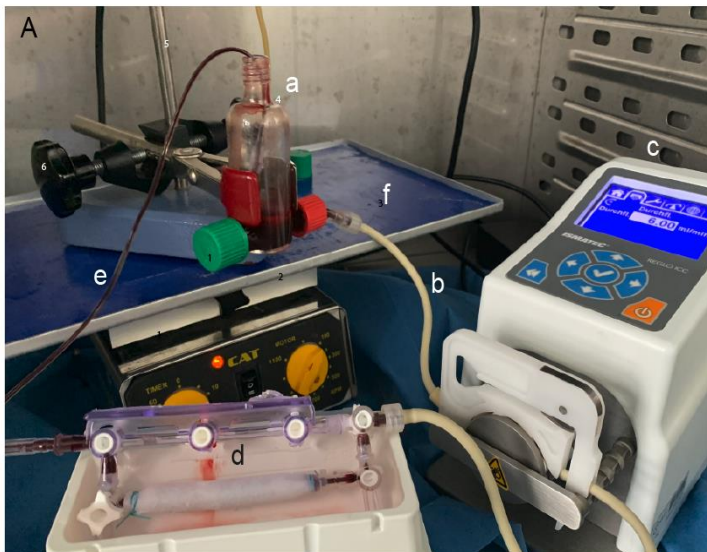
Insgesamt wurden 13 Versuche ausgewertet: 7 rTEVG und 6 mit Vollblut perfundierte rTEVG. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen dem Glukose- und Laktatwert am Tag vor Finalisierung des Versuchs (Tag 9) und der berechneten LECC untersucht (n=13).

2.7 Ex vivo-Vollblutperfusion der Gefäßtransplantate

Nachfolgend wird der Aufbau des Vollblutperfusionskreislaufs und der Versuchsaufbau der Experimente beschrieben.

2.7.1 Entwicklung eines geeigneten Kreislaufs für die Vollblutperfusion

Für die Durchführung der Vollblutperfusion wurde der für die dynamische Kultivierung der rezellularisierten Gefäßtransplantate verwendete Perfusionsaufbau adaptiert: Der wichtigste Aspekt dabei war die Reduktion der Anzahl der Verbindungsschläuche, sodass eine kleinere bzw. ähnliche Gesamtoberfläche der nicht-endothelialisierten Strukturen im Vergleich zum rezellularisierten Gefäßtransplantat erreicht werden konnte [1]. Der Kreislauf (**Abb. 3**) bestand aus einem Reservoir (a), einer Peristaltikpumpe (c) und einem



Pumpenschlauch (b), einem Behälter mit dem Gefäßtransplantat (d), einem Verbindungsschlauch (e) und einem Schüttler (f).

Abbildung 3: Vollblutperfusionskreislauf. Nach Entnahme wurde das Blut in das Reservoir gegeben (a) und durch den Pumpenschlauch (b), durch die Peristaltikpumpe (c), durch das Gefäßtransplantat (d) und den Verbindungsschlauch (e) zurück in das Reservoir gepumpt. Das Reservoir wurde kontinuierlich geschüttelt (f). Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

2.7.2 Vorbereitung für die Vollblutperfusion

Vor der Durchführung eines Experiments wurde zunächst das gesamte Perfusionssystem nach einem bereits etablierten Protokoll mit Heparin beschichtet [1, 25]. Das Perfusionssystem wurde zunächst 15 Minuten lang statisch mit dem polymeren Amin Polyallylamin (0,25 mg/ml, Corline Systems AB, Uppsala, Schweden) gelöst in Natriumboratpuffer (250 mM, pH 9) inkubiert. Anschließend wurde ein oberflächengebundener elektrostatischer Komplex durch Inkubation mit einer Lösung eines makromolekularen Heparin-Konjugats (Corline Heparin Conjugate, 0,1 mg/ml;

Corline Biomedical, Uppsala, Schweden) in Natriumacetatpuffer (0,1 M, 0,5 M NaCl, pH 4) für 60 Minuten gebildet. Nach jedem Schritt wurde das Perfusionssystem dreimal mit Milli-Q-Wasser gespült. Das gleiche Verfahren wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Das System wurde im Anschluss 15 Minuten lang in Natriumboratpuffer (250 mM, pH 9) inkubiert, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Schließlich folgte eine zehninminütige Inkubation in Essigsäureanhydridlösung (0,1 % in 250 mM Natriumboratpuffer, pH 10,5), um restliche Aminogruppen zu blockieren. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Gleichzeitig wurde eine 20 ml Spritze, mit der später das Blut entnommen werden sollte, mit 20 µl Heparin (100 U) gefüllt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das oben genannte Perfusionssystem aufgebaut. Es wurden drei verschiedene Versuchsgruppen mit Vollblut perfundiert [1]:

1. Die Vollblutperfusion des Perfusionssystems, um zu nachzuweisen, dass die Heparinisierung ausreichend und das System nicht thrombogen ist (Perfusionskreislauf, n=6);
2. Die Vollblutperfusion der dezellularisierten Gefäßtransplantate (dTEVG, n=6);
3. Die Vollblutperfusion der rezellularisierten Gefäßtransplantate (rTEVG, n=6).

Für die Vollblutperfusion des Perfusionskreislaufs wurden bei fehlendem Gefäßtransplantat nach Aufbau des Kreislaufs die Verbindungsschläuche beider Seiten miteinander verbunden. Für die Perfusion des dTEVG wurde das dezellularisierte Gefäß in das Perfusionssystem eingebettet. Abschließend wurde für die Vollblutperfusion des rTEVG das Gefäßtransplantat zusammen mit dem TEVG-haltigen-Kunststoffteil unmittelbar nach Beendigung der dynamischen Kultivierung am zehnten Tag in das Perfusionssystem eingebettet.

2.7.3 *Ex vivo* Vollblutperfusion

Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor dem Versuchsbeginn. Den Spendern wurde hierzu 20 ml Vollblut entnommen, welches in die heparinisierte Plastikspritze und in ein mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) präpariertes Probenröhrchen gegeben wurde. Dieses Röhrchen wurde für Prä-Perfusionsuntersuchungen verwendet (t₀, Kontrollgruppe). Nach Mischung des Bluts mit dem in der Spritze befindlichen Heparin durch leichtes Schütteln, wurde Blut in das Reservoir gegeben. Das bluthaltige Reservoir wurde auf einen Schüttler gestellt und kontinuierlich mit 90 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Peristaltikpumpe gestartet und das Gefäßtransplantat sowie der Pumpen- und

Verbindungsschlauch mit einer Rate von 6 ml/min mit Blut befüllt. Hier wurde die gleiche Flussrate appliziert, die während der zehntägigen dynamischen Kultivierung angewandt wurde. Der TEVG-haltige Kunststoffteil wurde in einen, mit zuvor erwärmtem PBS befüllten Behälter gestellt, um das Austrocknen des Gefäßtransplantats und den direkten Luftkontakt zu verhindern. Die Perfusionszeit wurde auf zwei Stunden festgelegt.

Die Auswertung der Hämolyseparameter mittels BGA zur Überwachung der Zellviabilität/Zellproliferation und die Entnahme von EDTA-Proben wurde für jeden Spender separat zu drei Zeitpunkten durchgeführt: vor der Perfusion (t 0), eine Stunde (t 1) nach Beginn der Perfusion und zwei Stunden (t 2) nach Beginn der Perfusion. Die gesammelten Proben wurden unmittelbar nach Entnahme an das Labor (Labor Berlin, Charité-Vivantes GmbH, Berlin, Deutschland) versandt. Um den Unterschied bezüglich der Thrombogenität zwischen dTEVG und rTEVG zu demonstrieren, wurde von jedem Spender insgesamt drei Mal Blut abgenommen (Perfusionskreislauf, dTEVG, rTEVG). Die Parameter des kleinen Blutbilds wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten verglichen [1].

2.9 Histologische Aufarbeitung und Überprüfung der Sterilität der Versuche

Zunächst wurden Übersichtsfärbungen von Paraffinschnitten der Proben aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen mit Hämatoxylin und Eosin (H&E, Applichem, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die anschließenden immunhistochemischen Färbungen wurde 0,01 M Citratpuffer für die Antigenrückgewinnung (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und 3 % Ziegen Serum zur Blockierung unspezifischer Bindungen (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden mit Permount-Medium (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Fotos der gefärbten Schnitte wurden mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen (**Tab. 2**) [1].

Tabelle 2: Übersicht der für die immunhistologischen Färbungen verwendeten Primärantikörper

Ziel	Wirt	Verdünnung	Cat.-No.	Hersteller
<i>Primäre Antikörper</i>				
Laminin	Kaninchen	1:50	ab11575	Abcam, Berlin, Deutschland
Collagen I	Kaninchen	1:400	ab6308	Abcam, Berlin, Deutschland
Collagen IV	Kaninchen	1:400	ab6586	Abcam, Berlin, Deutschland
CD34	Kaninchen	1:100	ab110643	Abcam, Berlin, Deutschland
CD31	Kaninchen	1:100	bs-0195R	Bioss Antibodies Inc, Woburn, USA
eNOS	Kaninchen	1:100	ab5589	Abcam, Berlin, Deutschland
vWF	Kaninchen	1:50	ab6994	Abcam, Berlin, Deutschland
CD90	Kaninchen	1:100	ab52625	Abcam, Berlin, Deutschland
CD41	Kaninchen	1:400	ab63983	Abcam, Berlin, Deutschland
CD45	Maus	1:100		Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
<i>Sekundäre Antikörper</i>				
Kaninchen	Ziegen	1:400	ab150080	Abcam, Berlin, Deutschland

2.9.1 Histologische Aufarbeitung der dBCA und der rebesiedelten TEVG

Zum Vergleich erfolgte zunächst eine histologische und immunhistochemische Charakterisierung der dBCA: die dezellularisierten Gefäße wurden für 24 h in Paraformaldehyd (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert, einer aufsteigenden Alkoholreihe ausgesetzt und schließlich in Paraffin (Sigma-Aldrich / Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E, Applichem, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Zur Bestätigung der erhaltenen Mikroanatomie der dBCA wurden Laminin, Collagen I und Collagen IV angefärbt [1].

Das gleiche Protokoll wurde für die Verarbeitung und H&E Färbung der rezellularisierten Gefäßtransplantate (rTEVG) verwendet [1]. Zusätzlich erfolgten immunhistochemische Analysen: hEPC wurden mit anti-CD34, anti-CD31, anti-eNOS und anti-von-Willebrand-Faktor Antikörper angefärbt; hMSC wurden mit anti-CD90-Antikörper angefärbt.

2.9.2 Histologische Aufarbeitung der rTEVG nach VBP

Nach Beendigung der Vollblutperfusion wurde das Gefäßsegment kurz in zuvor erwärmte Ringerlösung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) getaucht, um Restblut zu entfernen und anschließend 24 Stunden in Paraformaldehyd (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich in Paraffin (Sigma-Aldrich) eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden in 5 µm

dicke Schnitte geschnitten, mit H&E (Applichem, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und die LECC berechnet. Die immunhistochemische Charakterisierung von hEPC und hMSC wurde wie unter 2.9.1 beschrieben durchgeführt.

Zur histologischen Beurteilung der Thromboseresistenz von rTEVG und der Thrombogenität von dTEVG wurden dezellularisierte und rezellularisierte vollblutperfundierte Gefäßtransplantate mit einem Anti-CD41-Antikörper gefärbt.

Die CD41-Färbung zeigte als Nebenbefund mehrere Zellkerne an der luminalen Oberfläche der dezellularisierten Gefäßtransplantate, die jedoch nicht CD41 positiv waren. Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurde eine histologische Färbung mit H&E durchgeführt. Um zu bestätigen, dass es sich bei diesen Zellen nicht um hEPC oder native Endothelzellen als Folge einer unzureichenden Dezellularisierung handelte, wurde eine zusätzliche CD31 Färbung durchgeführt. Um weiterhin auszuschließen, dass diese Zellen Leukozyten waren, wurde eine Färbung mit einem anti-CD45-Antikörper (verdünnt mit *ProTaq Antibody Diluent*, BioCyc GmbH, Potsdam, Deutschland) durchgeführt [1].

2.9.3 Bioburden Analyse zur Überprüfung der Sterilität der Versuche

Im Anschluss an jeden Versuch wurde eine Bioburden-Analyse durchgeführt, um eine Kontamination auszuschließen [1]. Dazu wurden 5 ml Kulturmedium mit 7 ml SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression) gemischt und 24, 48, 72 und 96 Stunden lang bei 37 °C und 150 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Eine SOC/Sputum-Mischung wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Absorption wurde bei 425 und 600 nm mit dem NanoDrop 2000 C Uv-Vis-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Eine SOC/PBS-Probe wurde als *Blank* verwendet.

2.10 Statistik

Alle Daten wurden mit GraphPad Prism Version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) analysiert und visualisiert [1]. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk- und D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitätstest überprüft. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Im Falle normalverteilter Daten wurde zum Vergleich der Zellkulturparameter eine einfaktorische ANOVA (One-Way Analysis of Variance) bzw. der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test (für Daten ohne Gauß-Verteilung) angewandt. Für sich anschließende paarweise multiple Vergleiche wurden adäquate Post-hoc-Tests eingesetzt (Tukey- bzw. Dunn-Vergleichstest). Um die Sensitivität und Spezifität der Glukose als Indikator für die LECC

zu ermitteln, wurde eine ROC (Receiver operating characteristic)-Analyse durchgeführt. Der Cut-off-Wert wurde anhand des Youden-Index bestimmt. Für den Vergleich zwischen arterieller und venöser BGA wurde ein *paired* Student's t-Test durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) oder der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman wurden verwendet, um den Zusammenhang zwischen den BGA-Parametern und der histologischen Beurteilung zu untersuchen. Die Daten werden als 95 % Konfidenzintervall (CI) dargestellt. Ein p-Wert von weniger als 0,05 wurde als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Evaluation der Dezellularisierung

Im Rahmen dieses Projekts wurde darauf verzichtet, eine umfangreiche Charakterisierung der dBCA durchzuführen, da diese in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (publiziert von Seiffert et al. [16]) bereits erfolgt war [1]. Seiffert et al. konnten zeigen, dass die makroskopische Integrität der Gefäßtransplantate während des gesamten Dezellularisierungsprozesses intakt blieb. Die H&E-Färbung der dBCA zeigte, dass keine zellulären Reststrukturen vorhanden waren, wodurch eine effiziente Dezellularisierung bestätigt werden konnte (**Abb. 4 A**). Darüber hinaus wies die immunhistochemische Färbung mit Laminin- und Kollagen-IV-Antikörpern eine intakte Mikroanatomie der dBCA auf (**Abb. 4 B, C**).

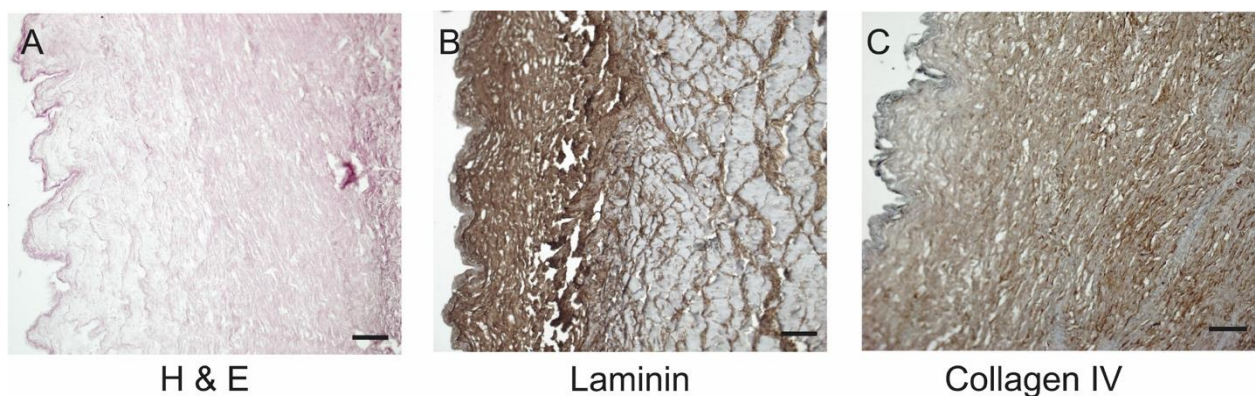


Abbildung 4: Histologische Charakterisierung der dezellularisierten Gefäße. Maßstabsbalken entspricht 50 μm . Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

3.2 Evaluation der Rezellularisierung

3.2.1 Blutgas-Analysen während der Rezellularisierung und der dynamischen Kultivierung

Zur Überwachung der Zellviabilität und der Stabilität der Zellkultur wurde eine regelmäßige Messung der BGA-Parameter durchgeführt. Während pH, pO_2 , pCO_2 , Na^+ und K^+ als Indikatoren für die Stabilität der Zellkultur verwendet wurden, dienten Glukose und Laktat als Indikatoren für die Zellproliferation und -lebensfähigkeit [1].

Während der 24-stündigen Rezellularisierung wurden die BGA-Parameter alle drei Stunden gemessen (t_3 , t_6 , t_9 , t_{12} , t_{15} , t_{18} , t_{21} , t_{24}). Hierbei erwies sich der pO_2 Wert als stabil, während sich der pH-Wert und pCO_2 Wert zusammen mit den Glukose- und

Laktatwerten änderten (**Abb. 5 A,B,C**). Der pH-Wert nahm kontinuierlich ab und zeigte zu allen Zeitpunkten eine statistisch signifikante Veränderung. Entsprechend dazu stieg der pCO₂ Wert im Verlauf signifikant. Die Glukosekonzentration fiel ab dem dritten Messzeitpunkt nach jeder Zellzugabe kontinuierlich ab und zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der ersten und der letzten Gabe sowie zwischen allen Zeitpunkten nach t₉ (**Abb. 5 D**). Im Gegensatz dazu stieg das Laktat allmählich an und zeigte nur während der ersten 3 Stunden der statischen Kultivierung eine unbedeutende Veränderung (**Abb. 5 E**). Diese Ergebnisse deuten auf eine kontinuierliche zelluläre Aktivität innerhalb des Gefäßtransplantats hin.

Während der dynamischen Perfusion wurden die BGA-Parameter täglich gemessen. Die Werte der venösen BGA für die weiteren Analysen verwendet. Um die optimale Dauer für die dynamische Kultivierung zu ermitteln, wurden die 14-tägige (n=5) und 10-tägige (n=8) dynamische Kultivierung miteinander verglichen. Obwohl die meisten Parameter bei beiden Protokollen vergleichbar waren, stieg der Glukose-Wert gegen Ende der Perfusion im 14-tägigen Protokoll allmählich auf den Ausgangswert an, was auf eine Ablösung der Zellen hindeutete. Eine detaillierte Analyse der Daten ergab einen minimalen, nicht statistisch signifikanten Anstieg des Glukosespiegels von Tag 10 bis Tag 14. Das Ergebnis von Tag 10 markierte somit den Wendepunkt für die Zellviabilität im Gefäßsegment **[1]**. Auf Grundlage dieser Daten erfolgte für weitere Experimente eine 10-tägige dynamische Kultivierung (n=8). Während der dynamischen Kultivierung zeigten sich die BGA-Parameter stabil. Der pH-Wert blieb im Wesentlichen physiologisch ($p > 0,999$, **Abb. 5 H**), die pO₂ und pCO₂ Werte blieben ebenfalls stabil (**Abb. 5 I,J**). Weiterhin zeigten sowohl Glukose als auch Laktat ein stabiles Niveau während der gesamten Perfusion, was darauf hindeutete, dass die Zellen im Transplantat nicht übermäßig wuchsen oder sich ablösten. Wie zu erwarten, verhielten sich Natrium- und Kaliumionen entsprechend (**Abb. 5 K,L,M,N**).

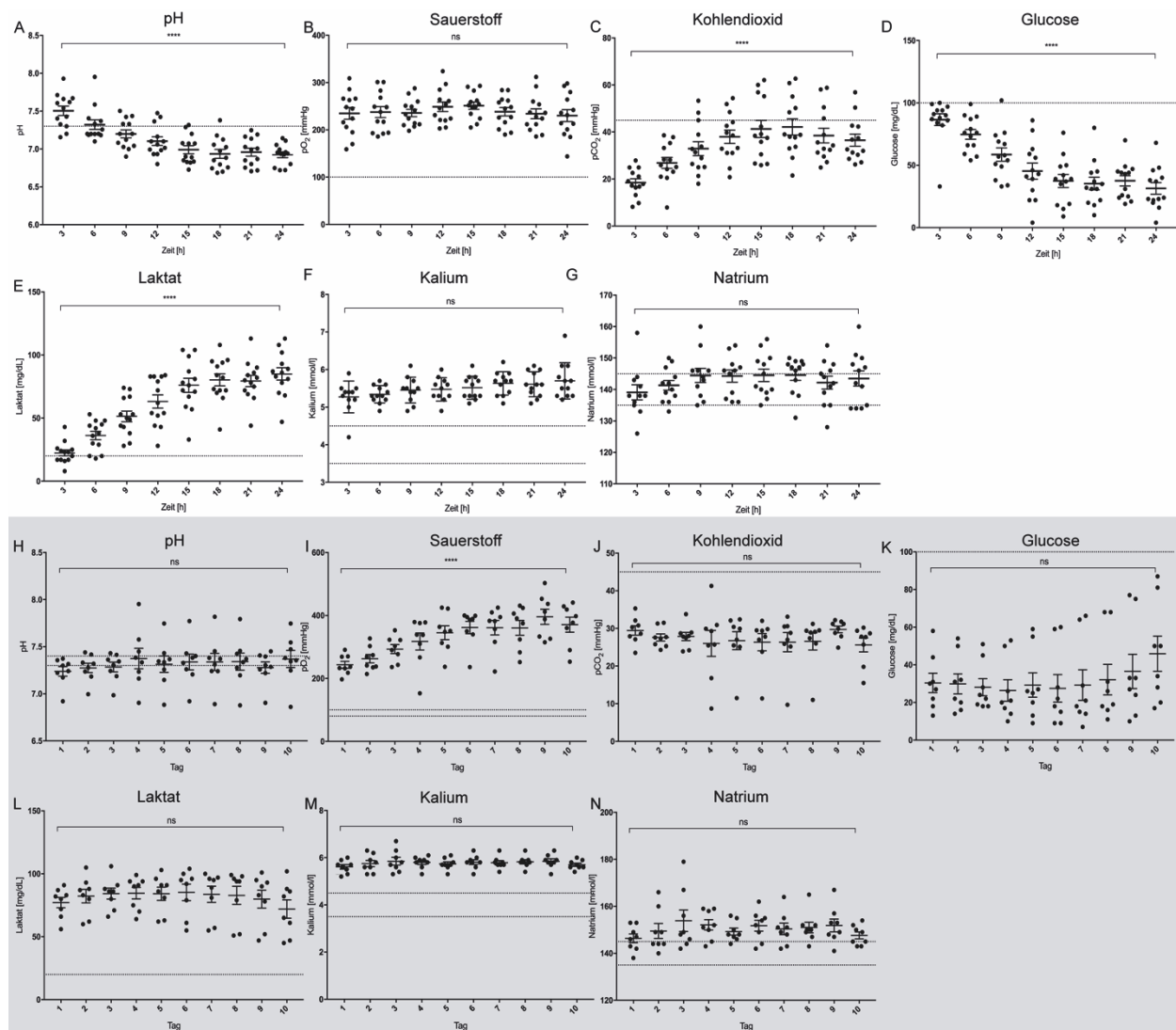


Abbildung 5: Zellkulturparameter während der Rezellularisierung und der dynamischen Kultivierung. pH (A), Sauerstoff (B), Kohlendioxid (C), Glucose (D), Laktat (E), Kalium (F) und Natrium (G) während der statischen Kultivierung des Gefäßes. pH (H), Sauerstoff (I), Kohlendioxid (J), Glucose (K), Laktat (L), Kalium (M) und Natrium (N) während der dynamischen Kultivierung. Die Punkte stellen verschiedene Experimente dar. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

3.2.2 Evaluation der Sterilität der Experimente (Bioburden Analyse)

Es wurde die Absorption des Überstandes des Zellkulturmediums (Kulturmedium + SOC (*Super Optimal Growth Medium*), n=13) mit der Absorption der Positivkontrolle (Kulturmedium + SOC + Sputum, n=3) nach 24, 48, 72 und 96 Stunden verglichen. Die Positivkontrolle zeigte zu allen Zeitpunkten und sowohl bei 425 als auch bei 600 nm eine konstante Kontamination, während im Versuchsaufbau keine Kontamination festgestellt werden konnte (**Abb. 10 F,G**, $p < 0,0001$ zu allen Zeitpunkten) [1].

3.2.3 Histologische Aufarbeitung

Um alle Zellen kontinuierlich mit Nährstoffen zu versorgen und um eine Zellablösung durch abrupt ansteigende Flussraten zu vermeiden, wurde während der dynamischen Kultivierung eine sub-physiologische Scherspannung appliziert. Die anfängliche Scherspannung von $0,0033 \text{ dyn/cm}^2$, wurde während der zehntägigen Kultivierung schrittweise auf $0,0330 \text{ dyn/cm}^2$ und während der 14-tägigen Kultivierung auf $0,0440 \text{ dyn/cm}^2$ erhöht. Die maximale Fließgeschwindigkeit im simulierten Gefäßtransplantat wurde im zentralen Teil des Gefäßlumens mit einem Wert von $0,0007 \text{ m/s}$ registriert (**Abb. 6**).

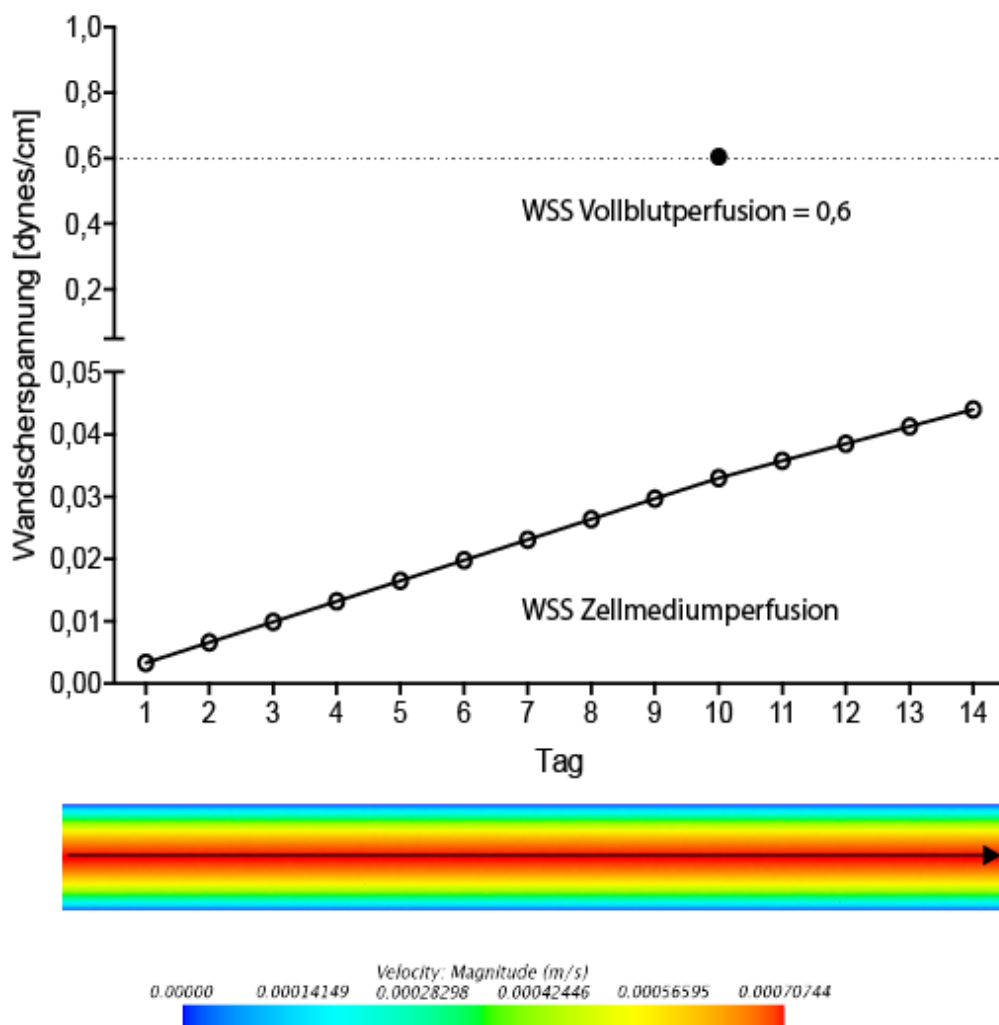


Abbildung 6: Die applizierte Scherspannung während der dynamischen Kultivierung und der Vollblutperfusion. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

Die oben aufgeführten Ergebnisse der BGA-Parameter wurden zudem durch histologische Analysen bestätigt. Die 24-Stunden-, 10-Tage- und 14-Tage-kultivierten

Gefäßtransplantate wurden miteinander verglichen (**Abb. 7**). Die histologische Färbung des nach 24-stündiger Rezellularisierung beendeten Kontrollversuchs zeigte intakte, morphologisch runde Zellen, die fest an der luminalen Oberfläche der Basalmembran lokalisiert waren (**Abb. 7 A**). Immunhistochemische Färbungen für CD31, CD34, eNOS und vWF bestätigten den endothelialen Ursprung der meisten dieser Zellen (**Abb. 7 B - E**). Außerdem zeigte die Färbung wenige CD90-positive hMSC, die unregelmäßig innerhalb der hEPC angeordnet waren (**Abb. 7 F**).

In der H&E-Färbung der 10-tägig dynamisch kultivierten Gefäßtransplantate konnte eine Intima besiedelt mit einer morphologisch flachen kontinuierlichen, fest anhaftenden zellulären Schicht nachgewiesen werden (**Abb. 7 G**). Wie die Färbungen für CD31, CD34, eNOS und vWF bestätigten, war die Mehrheit dieser Zellen vom endothelialen Phänotyp (**Abb. 7 H - K**). Die verringerte Anzahl CD90-positiver Zellen ließ darauf schließen, dass ein physiologischer Scherstress die Reifung der hMSC zu Endothelzellen beeinflusst (**Abb. 7 L**).

Die histologische Färbung der 14-tägigen dynamisch kultivierten Gefäßtransplantate zeigte hingegen eine diskontinuierlich flache zelluläre Schicht, wie bereits anhand der BGA Parameter vermutet werden konnte. (**Abb. 7 M - R**).

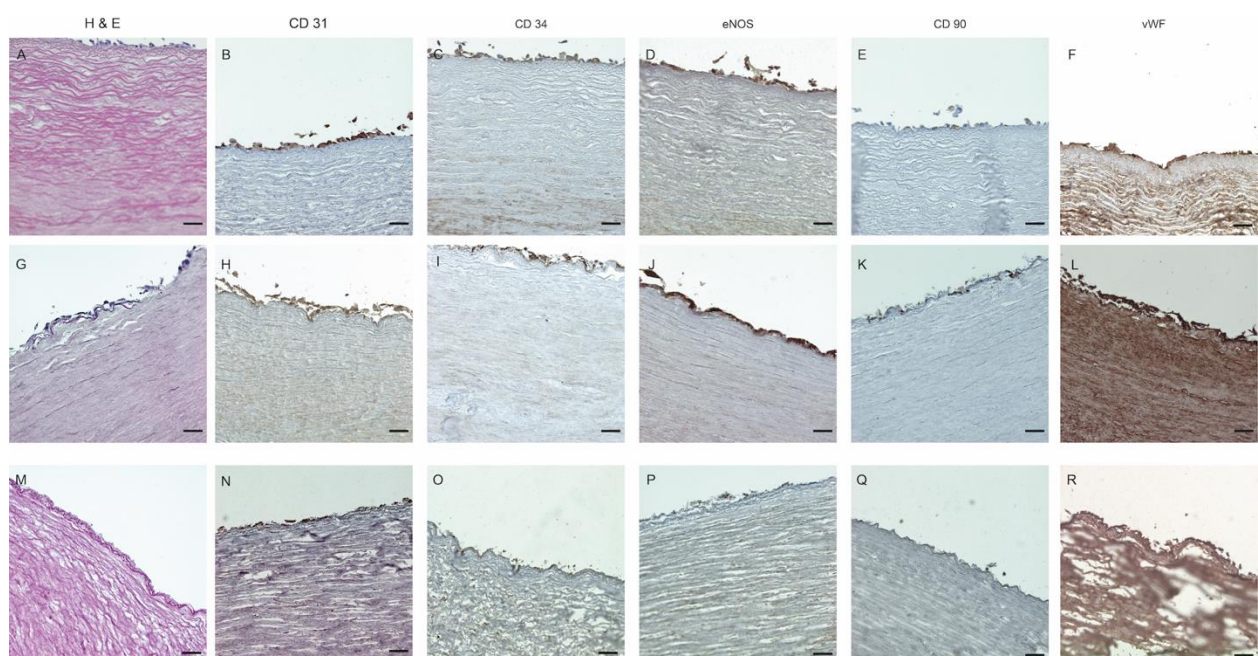


Abbildung 7: Histologische und immunhistochemische Auswertung der rezellularisierten Gefäßtransplantate. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

3.3 Evaluation der Thrombogenität der rezellularisierten Gefäßtransplantate

3.3.1 Endpunktanalysen bestätigten die Thromboresistenz der rezellularisierten Gefäßtransplantate

Um die Thromboresistenz der rezellularisierten Gefäßtransplantate beurteilen zu können, wurden dynamische Vollblutperfusionsexperimente durchgeführt. Während der zweistündigen Vollblutperfusion wurde eine physiologische venöse Schubspannung von $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ appliziert (**Abb. 6**). Obwohl eine arterielle Scherspannung physiologischer wäre, würde dies zu einer schnellen Erhöhung der Flussrate innerhalb kürzester Zeit und anschließend zu sehr hohen Hämolyseraten führen. Um das Ausmaß des mechanischen Traumas und der Hämolyse während der Vollblutperfusion beurteilen zu können, wurden Kalium- und Sauerstoffwerte zu drei verschiedenen Zeitpunkten (t_0 , t_1 , t_2) während der zweistündigen Perfusion gemessen. Beide Werte zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg in allen drei Versuchsgruppen (**Abb. 8 A,B**) [1].

Als wesentlicher Endpunkt für die Testung der Thrombogenität wurde das Verbrauch / das Abfangen der Thrombozyten eine Stunde und zwei Stunden nach Start der Vollblutperfusion gewählt. Zunächst wurde die Thromboresistenz des Perfusionskreislaufs untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenzahl in der ersten und zweiten Stunde der Perfusion festgestellt, was nicht nur die erfolgreiche Heparinbeschichtung, sondern auch die Verwendbarkeit des Perfusionssystems für unsere weiteren Vollblutperfusionsexperimente bestätigte (**Abb. 8 C**). Wie erwartet, zeigte die Perfusion des dTEVG mit Vollblut sowohl in der ersten als auch in der zweiten Stunde eine signifikant reduzierte Thrombozytenzahl (**Abb. 8 C**). Im Gegensatz dazu war die während der Vollblutperfusion des rezellularisierten Gefäßtransplantats verursachte Thrombozytendepletion statistisch nicht signifikant (rTEVG; t_0 vs. t_2 : $245,00 \pm 52,85$ vs. $205,33 \pm 128,38$, $p = 0,7284$, **Abb. 8 C**).

Die Thromboresistenz der rezellularisierten Gefäßtransplantate konnte auch anhand repräsentativer Bilder der luminalen Oberfläche von de- und rezellularisierten Transplantaten im Vergleich nachgewiesen werden [1]. Diese Aufnahmen zeigen eine makroskopische Thrombusbildung im Lumen der dezellularisierten Gefäße, jedoch nicht im Lumen der rezellularisierten Gefäßtransplantate (**Abb. 8 D,E**). Die an der luminalen Oberfläche der dezellularisierten Gefäße nachgewiesenen Zellen konnten in der immunhistochemischen Färbung als CD41-positive Thrombozyten identifiziert werden. Hingegen konnten in den rezellularisierten Gefäßtransplantaten keine CD41-positiven

Zellen nachgewiesen werden und somit die Thromboseresistenz dieser Transplantate bestätigt werden (**Abb. 8 F,G**). Bei der CD41-Färbung der dezellularisierten Gefäße wurden einige CD41-negative Zellen identifiziert (**Abb. 8 F**). Zur weiteren Untersuchung wurde eine H&E-Färbung durchgeführt. Diese zeigte azelluläre (**Abb. 8 I**) und zelluläre (**Abb. 8 H**) Bereiche des Lumens – ein Befund, der mit den CD41-negativen Zellen (**Abb. 8 F**) übereinstimmt. Darüber hinaus wurde eine Färbung mit einem Anti-CD31-Antikörper durchgeführt. Da die Zellen negativ für CD31 waren, wurde bestätigt, dass es sich bei diesen Zellen nicht um Endothelzellen und somit nicht um Reste einer nicht erfolgreichen Dezellularisierung handeln konnte (**Abb. 8 K**). Um die Herkunft dieser Zellen weiter zu untersuchen, wurden sie mit dem *leukocyte common antigen* (LCA, CD45) angefärbt. Diese Färbung ergab mehrere CD45-positive Zellen (**Abb. 8 J**) und deutete darauf hin, dass der Thrombus auch nach leichter Perfusion mit Ringerlösung, an der luminalen Oberfläche der dezellularisierten Gefäße anhaftete. Zusammenfassend wiesen die rezellularisierten Gefäßtransplantate keine makroskopische oder mikroskopische Thrombusbildung auf, während im Lumen der dezellularisierten Gefäße eine Vielzahl von Blutzellen festgestellt wurde, die sich mittels CD41- bzw. CD45-Färbung als Thrombozyten und Leukozyten identifizierten.

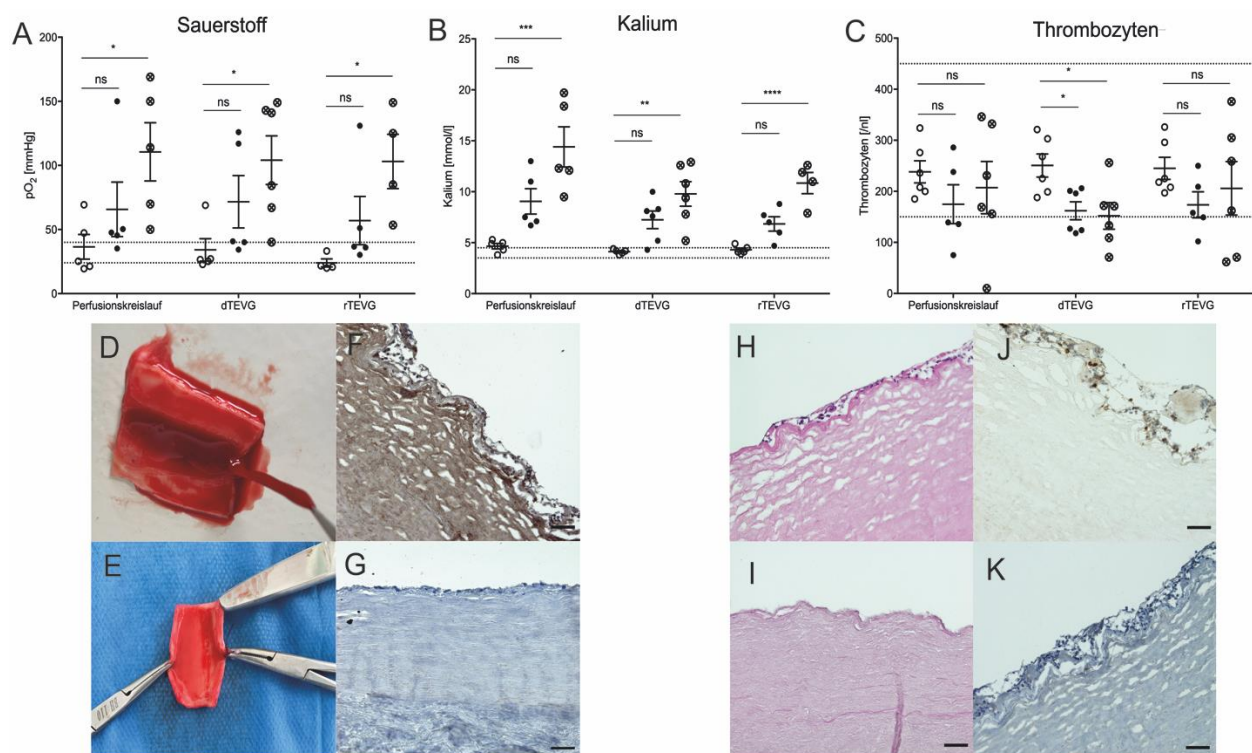


Abbildung 8: Vollblutperfusion von dezellularisierten und rezellularisierten Gefäßtransplantaten zur Prüfung der Thrombogenität. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

3.3.2 Histologische Aufarbeitung

Um die Integrität der endothelialen Monoschicht und die endotheliale Abdeckung der luminalen Oberfläche der Gefäßtransplantate nach der Vollblutperfusion zu bewerten, wurden histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt [1]. Bei der Beurteilung der gefärbten Gewebeschnitte konnten verschiedene Grade der Ablösung der Monoschicht von der Intima festgestellt werden (**Abb. 9**). Dies war jedoch auch bei den rezellularisierten Transplantaten ohne Vollblutperfusion der Fall, die für die Berechnung des LECC verwendet wurden. Es wurde daher angenommen, dass es sich um ein Artefakt handeln könnte, welches durch das Schneiden der Paraffinblöcke verursacht wurde. Obwohl die Zellen in einigen Schnitten von der luminalen Oberfläche abgelöst waren, zeigte die histologische Färbung mit H&E eine intakte zelluläre Bedeckung der Intima (**Abb. 9 A**). Die Morphologie der CD31-, CD34-, vWF- und eNOS-positiven hEPC und CD90-positiven hMSC war ähnlich wie in den nicht durchbluteten rezellularisierten TEVG (**Abb. 9 B - F**). Hervorzuheben ist, dass der hohe LECC auch nach der Vollblutperfusion erhalten blieb. Der Mittelwert der LECC der vollblutperfundierte Gefäßtransplantate (n=6) wurde auf $61 \pm 5 \%$ geschätzt [1].

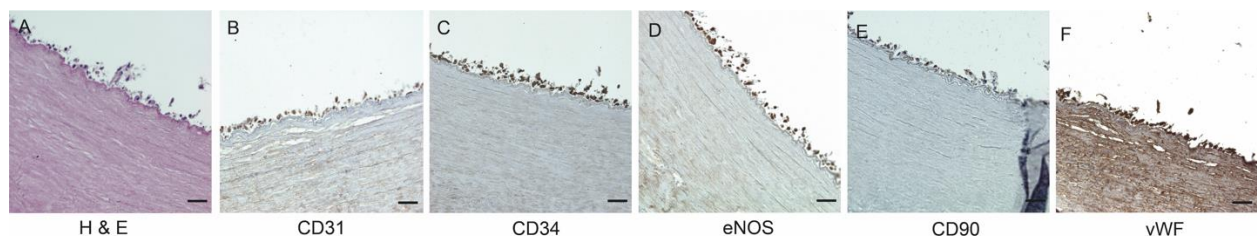


Abbildung 9: Histologische und immunhistochemische Auswertung der rezellularisierten Gefäßtransplantate nach Perfusion mit Vollblut. Maßstabsbalken: 50 µm. Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

3.4 Glucose und Laktat als Indikatoren für die luminal Endothelzellbedeckung (LECC)

Für die Evaluierung der Glucose- und Laktatwerte als Indikatoren für die LECC wurden nicht nur die Versuche der dynamischen Kultivierung verwendet, sondern auch die Vollblutperfusionsversuche. Daher werden die Ergebnisse an dieser Stelle zusammen aufgeführt [1]. Die LECC von 13 rezellularisierten Gefäßtransplantaten, die über 10 und 14 Tage dynamisch kultiviert wurden, wurden entsprechend bewertet. Die geschätzte LECC der 14-tägig perfundierten Gefäßtransplantate war $33 \pm 34,2 \%$. Die geschätzte

LECC der zehntägig perfundierten Gefäßtransplantate ergab $61,25 \pm 9,10$ %, wobei der höchste Wert 74 % und der niedrigste 47 % betrug. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Glukosewert des letzten Zeitpunkts der statischen Rebesiedelung (t24) kein optimaler Indikator für die LECC sein kann, da eine langfristig hohe Schubspannung letztlich zu einer Ablösung der zuvor angehafteten Zellen führen könnte. Wie angenommen, konnte keine signifikante Korrelation zwischen Glucose und Laktat am t24 und LECC am Tag der Beendigung des Versuchs festgestellt werden (**Abb. 10 A**).

Der Glukosewert am Vortag vor Beendigung der dynamischen Kultivierung (d9) erwies sich jedoch als geeigneterer Indikator. Die Analysen ergaben eine statistisch signifikante negative Korrelation, die zeigte, dass ein niedriger Glukosewert am neunten Tag mit einer hohen LECC korreliert und somit als zuverlässiger nicht-invasiver Indikator für die LECC des Gefäßtransplantats verwendet werden kann ($R^2 = 0,4877$, $r = -0,6983$, 95 % CI: -0,9022 bis -0,2395, $p = 0,0079$, **Abb. 10 B**). Die gleiche Analyse wurde für die Laktatproduktion durchgeführt. Glukosewerte unter 62 mg/dl konnten mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 87,5 % eine LECC > 60 % vorhersagen (Youden's Index: 0,8571). Die anhand der ROC-Analyse berechnete Fläche unter der Kurve betrug 0,9643 (CI: 0,8716 - 1,057, $p = 0,0053$, **Abb. 10 E**).

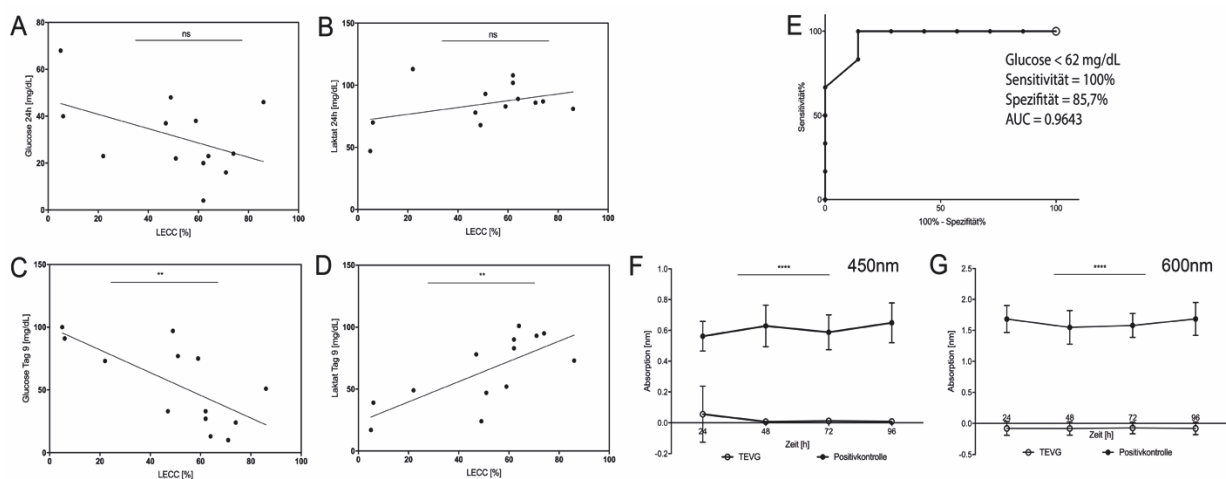


Abbildung 10: Glukose (**A**) und Laktat (**B**) als nichtinvasiver Indikator für die Luminalabdeckung von *in vitro* vorkonditioniertem TEVG nach der 24-stündigen statischen Rebesiedelung. Glukose (**C**) und Laktat (**D**) als nichtinvasiver Indikator für die Luminalabdeckung von *in vitro* vorkonditioniertem TEVG am Tag vor Beendigung der dynamischen Kultivierung. Die Analyse der ROC-Kurve ergab, dass ein Glukosegehalt von mehr als 62 mg/dL eine LC von mehr als 60 % vorhersagt (**E**). Die Bioburden-Analyse des Zellüberstands am letzten Tag der Kultivierung ergab, dass keine Kontamination vorliegt (**F**, **G**). Modifiziert aus *Keshi et al.* [1].

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Schaffung eines implantierbaren Gefäßersatzes Rinderkarotiden zunächst dezellularisiert und anschliessend mit hMSC und hEPC rezellularisiert und deren Thromboresistenz in einem *ex vivo* Vollblutperfusionskreislauf getestet. Für die Rezellularisierung wurden hEPC verwendet, welche aus Patientenblut isoliert wurden. Während der statischen Rebesiedelung und dynamischen Kultivierung wurden die Zellkulturparameter engmaschig überwacht, wodurch das Vorhandensein stabiler Zellkulturbedingungen während des gesamten Rebesiedelungsprozesses bestätigt werden konnte. Außerdem zeigte die Überwachung der Glukose- und Laktatwerte eine signifikante indirekte Korrelation zwischen dem Glukosewert am Tag vor Beendigung der dynamischen Kultivierung und dem Prozentsatz der luminalen Endothelzellbedeckung, wobei eine durchschnittliche Endothelzellbedeckung von 61 % erreicht werden konnte [1]. Dies bestätigte den Glukosespiegel als Referenzmarker zur Vorhersage der endothelialen Endothelzellbedeckung von Gefäßtransplantaten. Einer der wichtigsten Bestandteile dieser Studie war die *ex vivo* Testung der Thrombogenität der Gefäßtransplantate. Hierfür wurden rezellularisierte Gefäßtransplantate über zwei Stunden mit geringfügig heparinisiertem menschlichen Vollblut, welches in einem geschlossenen Perfusionssystem unter venöser Scherbelastung zirkulierte, perfundiert. Die Thrombozytendepletion wurde als Hauptendpunkt gewählt. Die Analysen zeigten, dass die Vollblutperfusion von rezellularisierten Gefäßtransplantaten eine nicht signifikante Thrombozytendepletion verursachte [1]. Wie vermutet, verursachte die Vollblutperfusion von dezellularisierten Gefäßtransplantaten jedoch eine signifikante Thrombozytendepletion. Dieser Befund bestätigte die Thromboresistenz der mit humanen vaskulären Zellen rezellularisierten dBCA.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse sind vor dem Hintergrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von autologen Venentransplantaten für die Herstellung personalisierter biologischer Gefäßtransplantate von großer Relevanz für die Gefäßchirurgie [1, 7,8]. Im Rahmen dieser Studie konnten zwei wichtige Aspekte für eine optimale Rezellularisierung und Präkonditionierung von biologischen

Gefäßtransplantaten bearbeitet werden: I) die Exposition von endothelialen Vorläuferzellen gegenüber einer physiologischen Fluss- und Scherspannung im Rahmen der Rebesiedlung und II) die kontinuierliche Überwachung der Zellkulturbedingungen [1, 26].

In dem hier dargestellten Ansatz wurden die Gefäßtransplantate während der dynamischen Kultivierung gezielt einer subphysiologischen WSS von $0,033 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt und während der späteren Vollblutperfusion auf eine physiologisch venöse WSS von $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ eingestellt. Die schrittweise Erhöhung der Scherbelastung führte zu einer histologisch sichtbaren Veränderung der Zellmorphologie und bereitete die Zellen auf die physiologische Scherbelastung vor, der sie während der Vollblutperfusionsexperimente *ex vivo* ausgesetzt waren [1]. Allerdings ist es äußerst schwierig, unter *ex vivo* Perfusionsbedingungen physiologische arterielle Flussraten und Scherspannungen zu erreichen, so dass Implantationsexperimente unerlässlich sind [27]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hEPC waren nach Applizierung der zunächst subphysiologischen, danach venösen Scherbelastung nicht nur für EPC-Marker wie CD34, sondern auch für reife EC-Marker wie CD31, vWF und eNOS positiv gefärbt (**Abb. 7 A - L**) [1]. Zusätzlich zeigte die Färbung mit dem Anti-CD90 Antikörper eine Abnahme der CD90-positiven hMSC nach der dynamischen Kultivierung, was auf eine Reifung dieser Zellen zu Endothelzellen als Folge des applizierten physiologischen Scherstress hinweist (**Abb. 7 L**). Während hEPC eine gute Option für personalisierte Gefäßtransplantate darstellen, können die aus der Nabelschnur isolierten, humanen mesenchymalen Stammzellen nicht ausschließlich als Alternative dafür eingesetzt werden. Studien haben jedoch gezeigt, dass die Möglichkeit besteht, hMSC aus dem Fettgewebe zu isolieren und diese Form der Zellgewinnung nur einen minimal invasiven Eingriff ohne größere Morbiditätsraten und lange Krankenhausaufenthalte erfordert [1, 28, 29].

Die kontinuierliche Überwachung der Zellkulturparameter wie pH, pO_2 , pCO_2 , Natrium und Kalium in der vorliegenden Studie zeigte das Vorhandensein von stabilen Zellkulturbedingungen. Außerdem ergab die Überwachung der Glukose- und Laktatwerte eine signifikante indirekte Korrelation zwischen dem Glukosewert am Tag vor Beendigung der dynamischen Kultivierung und dem Prozentsatz der luminalen Endothelzellbedeckung [1]. Dies bestätigte die Eignung des Glukosespiegels als Referenzmarker zur Vorhersage der Endothelzellbedeckung von Gefäßtransplantaten. Die in der Studie erzielte durchschnittliche Endothelzellbedeckung von 61 % unterstreicht

die Gültigkeit des angewandten Modells [1]. Die eigenen Resultate unterstützen Ergebnisse einer früheren Studie, in der die Glukoseverbrauchsrate (GCR) als Indikator für das Wachstum von Endothelzellen und als Vorhersage für die Leistung *in vivo* verwendet wurde [30].

Neben der Rezellularisierung stellte die Überprüfung der Thromboresistenz der konstruierten Gefäßtransplantate durch deren *ex vivo* Perfusion mit menschlichem Vollblut den zweiten wichtigen Teil dieser Studie dar. Hierfür mussten zwei Hauptparameter definiert werden: die Dauer der Perfusion und die Auswahl des Endpunkts. Die Perfusionsdauer wurde auf zwei Stunden begrenzt. Hierdurch sollte eine Hämolyse durch ein mechanisches Trauma vermieden werden, welches durch Perfusionssysteme mit hoher Scherbelastung und peristaltischen Pumpen entstehen kann. Die K⁺ Werte, die zur Bewertung des Ausmaßes dieses Phänomens gemessen wurden, zeigten, dass die Hämolyse mit der Zeit allmählich zunahm und wie angenommen in der Gruppe ohne TEVG insgesamt deutlich stärker ausgeprägt war [1]. Der zu drei Zeitpunkten ermittelte pO₂ Wert zeigte jedoch, dass keine Hypoxie vorlag, die bekanntermaßen ebenfalls eine umfangreiche Hämolyse verursachen kann [1, 31]. Diese Ergebnisse verstärkten das Vertrauen in die Vorteile einer *in vitro* Rezellularisierung.

Als wichtigster Endpunkt für die Testung der Thrombogenität der rezellularisierten Gefäßtransplante wurde die Thrombozytenzahl bzw. der Thrombozytenverbrauch ausgewählt. Zu Beginn war beabsichtigt worden, den aufgrund von Thrombusbildung verursachten intravaskulären Druckanstieg als Hauptendpunkt zu verwenden. Dieses Vorgehen erwies sich jedoch als nicht praktikabel, da eine relevante Thrombusbildung sehr lange Perfusionszeiten von bis zu 20 Stunden erforderte und mit extremer Hämolyse assoziiert war. Daher wurde die Thrombozytenzahl als Hauptendpunkt für die Bewertung der Thromboresistenz verwendet [1]. Nach mehreren Versuchen stimmte dieser Endpunkt mit dem implementierten Flussprofil überein, war logistisch effektiv und ermöglichte eine korrekte Bewertung der Relevanz der initialen Hypothese. Die Vollblutperfusion der rezellularisierten Gefäßtransplantate verursachte keine signifikante Thrombozyten-depletion, wodurch deren Thromboresistenz bestätigt werden konnte. Wie vermutet, lieferte die signifikante Thrombozytendepletion sowohl in der ersten als auch in der zweiten Stunde während der Vollblutperfusion von dezellularisierten, nicht rebesiedelten Gefäßen einen weiteren Beweis für die weithin anerkannte sofortige Thrombogenität der exponierten ECM [1, 19].

4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Zahlreiche Studien geben Einblicke in das Thema der *in vitro* Rezellularisierung von Gefäßtransplantaten mit Endothelzellen, indem sie die Wirksamkeit, Vorteile und Grenzen dieses Ansatzes erläutern [1, 32-35]. Die Rezellularisierung der luminalen Oberfläche mit vaskulären Zellen ist entscheidend für die langfristige Durchgängigkeit der Gefäßtransplantate *in vivo* [36-39]. In einer kürzlich publizierten Metaanalyse stellten die Autoren zum ersten Mal fest, dass azelluläre *tissue engineered vascular grafts* (TEVG, Gefäßtransplantate) eine geringere Durchgängigkeit aufwiesen (62,4 %) als rezellularisierte Gefäßtransplantate (85,1 %) [13]. *Meinhart et al.* berichteten, dass *in vitro* rezellularisierte PTFE-Gefäßtransplantate eine deutlich bessere Durchgängigkeit, vergleichbar mit der Durchgängigkeit autologer Venentransplantate, aufweisen, als nicht besiedelte synthetische Gefäßtransplantate [40-42]. Für eine Rezellularisierung erwiesen sich endotheliale Vorläuferzellen als hervorragende Alternative zu reifen Endothelzellen, da sie aus peripherem Blut durch routinemäßige Venenpunktion ohne einen zusätzlichen invasiven Eingriff isoliert werden können [43-46]. Tatsächlich haben weitere relevante Studien, u.a. von *Hinds et al.* [47, 48], *Tranquillo et al.* [49] und *Truskey et al.* [50], endotheliale Vorläuferzellen für die Konstruktion von Gefäßtransplantaten eingesetzt. Ähnlich zu der hier aufgeführten Studie, zeigt der bisherige Forschungsstand, dass endotheliale Vorläuferzellen Marker von reifen Endothelzellen exprimieren, wenn sie physiologischem Scherstress und einer Langzeitkultur ausgesetzt werden [51]. Darüber hinaus berichten viele Autoren, dass MSC die Lebensfähigkeit von EC durch die Freisetzung parakriner Faktoren erhöhen, ein Effekt, der unter physiologischem Scherstress noch verstärkt wird [52-55].

Die *ex vivo* Untersuchung der Thromboresistenz im Falle einer Vollblutperfusion zeigt sich auch in der bisherigen Literatur als herausfordernd [1]. Aufgrund der damit verbundenen logistischen Schwierigkeiten haben sich viele Gruppen auf alternative Untersuchungsmethoden konzentriert [43, 56-58]. Andere Arbeitsgruppen haben versucht, die physiologischen Blutflussbedingungen nachzuahmen, entweder durch Schütteln [59] oder durch Aussetzen eines dynamischen Blutflusses unter Verwendung verschiedener Methoden, wie z. B. des Baumgartner-Tests [60-64]. Des Weiteren scheint in Vollblutperfusionstudien die Auswahl des Endpunkts entscheidend zu sein und sollte in Abhängigkeit des jeweiligen Durchflussregimes und den zu vergleichenden Oberflächen gewählt werden. Die vorhandene Literatur zeigt, dass

Thrombogenitätsstudien mit hohen Flussraten die signifikantesten Unterschiede zwischen besiedelten und nicht besiedelten Oberflächen aufweisen [19,65]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der Endpunkt in der eigenen gewählt.

Die in der aktuellen Studie erreichten Ergebnisse der Vollblutperfusionsversuche stimmen weitgehend mit den Ergebnissen einer Studie von Kaplan et al. überein, in der von einem signifikanten Verbrauch der Thrombozytenanzahl nach Vollblutperfusion von unbeschichteten PVC-Folien berichtet wurde, während die Perfusion von Fibrinogen-/Heparin-beschichteten Folien keine signifikante Veränderung ergab [1, 61]. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wurden in der Studie von Kaplan et al. auch bei anderen Parametern des kleinen Blutbilds (*complete blood count*, CBC) wie weißen Blutkörperchen, Hämoglobin, Hämatokrit und roten Blutkörperchen keine signifikanten Veränderungen festgestellt [1, 61]. Die Hauptursache für diese Diskrepanzen könnte das erhebliche mechanische Trauma sein, das mit der hohen Scherbeanspruchung und der Verwendung einer Peristaltikpumpe verbunden ist [1]. Diese Faktoren fehlen in der Studie von Kaplan et al., in welcher der Blutfluss im *Chandler's Loop* durch eine Rotation mit 30 rpm gewährleistet wurde, was eine minimale mechanische Belastung der Zellen zur Folge hat [61].

4.4 Stärken und Schwächen der Studie

Die vorliegende Studie zeigt diverse experimentelle Einschränkungen [1]. Zum einen ist die *in vitro* Rezellularisierung dezellularisierter Gefäßtransplantate sehr arbeitsintensiv. Zum anderen ist es herausfordernd, trotz Verwendung sehr hohen Zellzahlen, eine LECC von 100 % zu erreichen. Darüber hinaus ist es nicht gelungen, die rezellularisierten TEVG einer physiologischen arteriellen Scherbelastung auszusetzen, die von weniger als 1 dyn/cm² bis 600 dyn/cm² variierte [66, 67]. Hingegen wurden die TEVG lediglich einer subphysiologischen Scherbelastung während der Rezellularisierung und Kultivierung sowie einer venösen Scherbelastung während der Perfusion mit Vollblut ausgesetzt. Um eine arterielle Scherbelastung zu erreichen, sind Perfusionsraten von 860 ml/min bis 1460 ml/min notwendig [1]. Unter den Bedingungen der aktuellen Studie würden diese Flussraten entweder einen abrupten Anstieg der Flussraten oder einen langsamen Anstieg über einen sehr langen Kultivierungszeitraum bedeuten. Beides würde jedoch zur Ablösung der Zellen führen [1]. Daher bleibt eine abschließende Evaluierung dieser Gefäßtransplantate nach Implantation unerlässlich.

Die hier durchgeführten *ex vivo* Vollblutperfusionsexperimente zeigen ebenso einige Limitationen auf [1]. Die Verbindungsschläuche des Perfusionssystems provozieren unvermeidlich Veränderungen der Parameter des kleinen Blutbilds, die nicht auf die Eigenschaften des Gefäßtransplantats zurückzuführen sind. Die Vergrößerung der Oberfläche des getesteten Gefäßtransplantats im Verhältnis zu der der Verbindungsschläuche, oder die Beschichtung der Verbindungsschläuche mit Heparin, sind mögliche Alternativen, um die transplantatspezifische Thrombogenität isoliert darzustellen. Leider überstieg in der aktuellen Studie die für den Vollblutperfusionsaufbau erforderliche Oberfläche der Verbindungsschläuche die Oberfläche des Gefäßtransplantats. Daher wurde der Perfusionskreislauf mit Heparin beschichtet und separat die Thrombogenität des Kreislaufs ohne Transplantat bestimmt [1]. Eine weitere Schwäche der aktuellen Studie ist, dass nicht untersucht wurde, ob die Heparinisierung der Verbindungsschläuche auch das Vollblut weiter heparinisiert. Des Weiteren wird vermutet, dass die Variabilität der Vollblutspender eine Auswirkung auf die Vollblutperfuionsversuche haben könnte. Schließlich könnten auch die bovinen Karotiden mit ihrer unterschiedlichen Makroarchitektur zu den Unstimmigkeiten bei der makroskopischen Thrombusbildung auf der luminalen Oberfläche des TEVG beigetragen haben.

4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung

In vitro rezellularisierte Gefäßtransplantate finden bisher keine klinische Anwendung. In der aktuellen Studie konnten wir eine Methode zur Herstellung eines Gefäßtransplantats etablieren, die auf der Technik des *Tissue Engineering* basiert. Das Konstrukt besteht aus einem dezellularisierten biologischen Gefäßtransplantat und humanen vaskulären Zellen zur Rezellularisierung. In der Zukunft könnten Gefäßtransplantate personalisiert, d.h. patientenspezifisch unter Verwendung autologer Zellen zur Rebesiedelung hergestellt werden. Diese biologischen Gefäßtransplantate sind weniger thrombogen und mit niedrigeren Infektionsraten nach Transplantation im Vergleich zu synthetischen Transplantaten verbunden.

Präklinisch könnte durch die Testung der Thrombogenität dieser Gefäßtransplantate in einem *ex vivo* Vollblut-Perfusionssystem mit menschlichem Blut ein wichtiger Meilenstein in diesem logistisch anspruchsvollen Thema erreicht werden. Die in dieser Studie angewandte Methodik zur Rezellularisierung der dezellularisierten Transplantate,

Überwachung der Zellkulturbedingungen, Vorhersage der LECC und abschließenden *ex vivo* Überprüfung der Thrombogenität der Gefäßtransplantate, könnten in der Forschung genutzt werden, um nicht nur das *Tissue Engineering* von Gefäßtransplantaten, sondern auch das *Tissue Engineering* ganzer Organe voranzubringen.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend bestätigt diese Studie die *ex vivo* Thromboseresistenz von biologischen, mit vaskulären Zellen rezellularisierten Gefäßtransplantaten. Die Ergebnisse der *ex vivo* Vollblutperfusion zeigten, dass der Thrombozytenverbrauch während der Perfusion von dezellularisierten Gefäßen deutlich höher war als der nicht signifikante Verbrauch während der Vollblutperfusion von rezellularisierten Gefäßtransplantaten. Zusätzlich konnte die kontinuierliche Messung der Glukosekonzentration als geeigneter nicht-invasiver Prädiktor der luminalen Endothelzellbedeckung des rezellularisierten Gefäßtransplantats nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Keshi, P. Tang, M. Weinhart, H. Everwien, S. Moosburner, N. Seiffert, M. Lommel, U. Kertzsch, B. Globke, A. Reutzel-Selke, B. Strucker, J. Pratschke, I.M. Sauer, N. Haep, K.H. Hillebrandt, Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity, *J Biol Eng* 15(1) (2021) 26.F.
- [2] G.A. Roth, M.D. Huffman, A.E. Moran, V. Feigin, G.A. Mensah, M. Naghavi, C.J. Murray, Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013, *Circulation* 132(17) (2015) 1667-78.
- [3] L.J. Laslett, P. Alagona, Jr., B.A. Clark, 3rd, J.P. Drozda, Jr., F. Saldivar, S.R. Wilson, C. Poe, M. Hart, The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology, *J Am Coll Cardiol* 60(25 Suppl) (2012) S1-49.
- [4] A.T. Hirsch, Z.J. Haskal, N.R. Hertzler, C.W. Bakal, M.A. Creager, J.L. Halperin, L.F. Hiratzka, W.R. Murphy, J.W. Olin, J.B. Puschett, K.A. Rosenfield, D. Sacks, J.C. Stanley, L.M. Taylor, Jr., C.J. White, J. White, R.A. White, E.M. Antman, S.C. Smith, Jr., C.D. Adams, J.L. Anderson, D.P. Faxon, V. Fuster, R.J. Gibbons, S.A. Hunt, A.K. Jacobs, R. Nishimura, J.P. Ornato, R.L. Page, B. Riegel, S. American Association for Vascular, S. Society for Vascular, A. Society for Cardiovascular, Interventions, M. Society for Vascular, Biology, R. Society of Interventional, A.A.T.F.o.P.G.W.C.t.D.G.f.t.M.o.P.W.P.A. Disease, C. American Association of, R. Pulmonary, L. National Heart, I. Blood, N. Society for Vascular, C. TransAtlantic Inter-Society, F. Vascular Disease, ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation, *Circulation* 113(11) (2006) e463-654.
- [5] S. Li, D. Sengupta, S. Chien, Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ, *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 6(1) (2014) 61-76.
- [6] P.L. Faries, F.W. Logerfo, S. Arora, S. Hook, M.C. Pulling, C.M. Akbari, D.R. Campbell, F.B. Pomposelli, Jr., A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: all-autogenous conduit versus prosthetic grafts, *J Vasc Surg* 32(6) (2000) 1080-90.
- [7] R.J. Zdrachala, Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art, *J Biomater Appl* 10(4) (1996) 309-29.
- [8] H. Bergmeister, N. Seyidova, C. Schreiber, M. Strobl, C. Grasl, I. Walter, B. Messner, S. Baudis, S. Frohlich, M. Marchetti-Deschmann, M. Griesser, M. di Franco, M. Krssak, R. Liska, H. Schima, Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements, *Acta Biomater* 11 (2015) 104-13.

- [9] R.D. Kirkton, H.L. Prichard, M. Santiago-Maysonet, L.E. Niklason, J.H. Lawson, S.L.M. Dahl, Susceptibility of ePTFE vascular grafts and bioengineered human acellular vessels to infection, *J Surg Res* 221 (2018) 143-151.
- [10] N.O. Abutaleb, G.A. Truskey, Human iPSCs Stretch to Improve Tissue-Engineered Vascular Grafts, *Cell Stem Cell* 26(2) (2020) 136-137.
- [11] K.H. Hillebrandt, H. Everwien, N. Haep, E. Keshi, J. Pratschke, I.M. Sauer, Strategies based on organ decellularization and recellularization, *Transpl Int* 32(6) (2019) 571-585.
- [12] S.D. Patel, M. Waltham, A. Wadoodi, K.G. Burnand, A. Smith, The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia, *Ther Adv Cardiovasc Dis* 4(2) (2010) 129-41.
- [13] I. Skovrind, E.B. Harvald, H. Juul Belling, C.D. Jorgensen, J.S. Lindholt, D.C. Andersen, Concise Review: Patency of Small-Diameter Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Meta-Analysis of Preclinical Trials, *Stem Cells Transl Med* 8(7) (2019) 671-680.
- [14] X. Chen, B. Chen, Y. Yang, Y. Zhou, F. Liu, M. Gai, Q. Chen, Y. Ma, [Isolation, culture and identification of human umbilical vein endothelial cells], *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 32(3) (2016) 328-31.
- [15] V.N.S. Garikipati, R. Kishore, Endothelial Progenitor Cells: Procedure for Cell Isolation and Applications, *Methods Mol Biol* 1553 (2017) 85-89.
- [16] N. Seiffert, P. Tang, E. Keshi, A. Reutzel-Selke, S. Moosburner, H. Everwien, D. Wulsten, H. Napierala, J. Pratschke, I.M. Sauer, K.H. Hillebrandt, B. Struecker, In vitro recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells, *J Biol Eng* 15(1) (2021) 15.
- [17] J. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher, H.P. Wendel, K. Schenke-Layland, C. Harasztosi, S. Hu, U.A. Stock, Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity, *Biomaterials* 31(9) (2010) 2549-54.
- [18] X. Ren, P.T. Moser, S.E. Gilpin, T. Okamoto, T. Wu, L.F. Tapias, F.E. Mercier, L. Xiong, R. Ghawi, D.T. Scadden, D.J. Mathisen, H.C. Ott, Engineering pulmonary vasculature in decellularized rat and human lungs, *Nat Biotechnol* 33(10) (2015) 1097-102.
- [19] A.P. McGuigan, M.V. Sefton, The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity, *Biomaterials* 28(16) (2007) 2547-71.
- [20] M. Weber, H. Steinle, S. Golombek, L. Hann, C. Schlensak, H.P. Wendel, M. Avci-Adali, Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility, *Front Bioeng Biotechnol* 6 (2018) 99.
- [21] Y. Banz, T. Cung, E.Y. Korchagina, N.V. Bovin, A. Haeberli, R. Rieben, Endothelial cell protection and complement inhibition in xenotransplantation: a novel in vitro model using whole blood, *Xenotransplantation* 12(6) (2005) 434-43.
- [22] H. Everwien, E. Keshi, K.H. Hillebrandt, B. Ludwig, M. Weinhart, P. Tang, A.S. Beierle, H. Napierala, J.M. Gassner, N. Seiffert, S. Moosburner, D. Geisel, A. Reutzel-Selke, B. Strucker, J. Pratschke, N. Haep, I.M. Sauer, Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model, *Acta Biomater* 117 (2020) 213-225.
- [23] R. A. P. M. L. Huber, A. Laesecke, D. G. Friend, New International Formulation for the Viscosity of H₂O, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* (101) (2009).

- [24] F. Abraham, M. Behr, M. Heinkenschloss, Shape optimization in steady blood flow: a numerical study of non-Newtonian effects, *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 8(2) (2005) 127-37.
- [25] J. Leijon, F. Carlsson, J. Brannstrom, J. Sanchez, R. Larsson, B. Nilsson, P.U. Magnusson, M. Rosenquist, Attachment of flexible heparin chains to gelatin grafts improves endothelial cell infiltration, *Tissue Eng Part A* 19(11-12) (2013) 1336-48.
- [26] H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, T. Matsuda, The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft, *Biomaterials* 28(3) (2007) 486-95.
- [27] S.K. Yazdani, B.W. Tillman, J.L. Berry, S. Soker, R.L. Geary, The fate of an endothelium layer after preconditioning, *J Vasc Surg* 51(1) (2010) 174-83.
- [28] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284(5411) (1999) 143-7.
- [29] W. Wagner, F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge, A.D. Ho, Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Exp Hematol* 33(11) (2005) 1402-16.
- [30] M.F. Shaheen, D.J. Joo, J.J. Ross, B.D. Anderson, H.S. Chen, R.C. Huebert, Y. Li, B. Amiot, A. Young, V. Zlochiver, E. Nelson, T. Mounajjed, A.B. Dietz, G. Michalak, B.G. Steiner, D.S. Davidow, C.R. Paradise, A.J. van Wijnen, V.H. Shah, M. Liu, S.L. Nyberg, Sustained perfusion of revascularized bioengineered livers heterotopically transplanted into immunosuppressed pigs, *Nat Biomed Eng* 4(4) (2020) 437-445.
- [31] R. Grygorczyk, S.N. Orlov, Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties-Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow, *Front Physiol* 8 (2017) 1110.
- [32] H. Yuan, C. Chen, Y. Liu, T. Lu, Z. Wu, Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts, *J Biomed Mater Res A* 108(3) (2020) 426-445.
- [33] X. Ma, Z. He, L. Li, G. Liu, Q. Li, D. Yang, Y. Zhang, N. Li, Development and in vivo validation of tissue-engineered, small-diameter vascular grafts from decellularized aortae of fetal pigs and canine vascular endothelial cells, *J Cardiothorac Surg* 12(1) (2017) 101.
- [34] S. Lau, D. Eicke, M. Carvalho Oliveira, B. Wiegmann, C. Schrimpf, A. Haverich, R. Blasczyk, M. Wilhelmi, C. Figueiredo, U. Boer, Low Immunogenic Endothelial Cells Maintain Morphological and Functional Properties Required for Vascular Tissue Engineering, *Tissue Eng Part A* 24(5-6) (2018) 432-447.
- [35] Y. Zhang, X.S. Li, A.G. Guex, S.S. Liu, E. Muller, R.I. Malini, H.J. Zhao, M. Rottmar, K. Maniura-Weber, R.M. Rossi, F. Spano, A compliant and biomimetic three-layered vascular graft for small blood vessels, *Biofabrication* 9(2) (2017) 025010.
- [36] M.A. Cleary, E. Geiger, C. Grady, C. Best, Y. Naito, C. Breuer, Vascular tissue engineering: the next generation, *Trends Mol Med* 18(7) (2012) 394-404.
- [37] M. Yamanami, K. Kanda, T. Kawasaki, D. Kami, T. Watanabe, S. Gojo, H. Yaku, Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications, *Artif Organs* 43(8) (2019) 773-779.

- [38] J.W. Reinhardt, J.D.R. Rosado, J.C. Barker, Y.U. Lee, C.A. Best, T. Yi, Q. Zeng, S. Partida-Sanchez, T. Shinoka, C.K. Breuer, Early natural history of neotissue formation in tissue-engineered vascular grafts in a murine model, *Regen Med* 14(5) (2019) 389-408.
- [39] Z.H. Syedain, M.L. Graham, T.B. Dunn, T. O'Brien, S.L. Johnson, R.J. Schumacher, R.T. Tranquillo, A completely biological "off-the-shelf" arteriovenous graft that recellularizes in baboons, *Sci Transl Med* 9(414) (2017).
- [40] Y.M. Ju, H. Ahn, J. Arenas-Herrera, C. Kim, M. Abolbashari, A. Atala, J.J. Yoo, S.J. Lee, Electrospun vascular graft for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study, *Acta Biomater* 59 (2017) 58-67.
- [41] J.G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Froschl, P. Zilla, Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts, *Ann Thorac Surg* 71(5 Suppl) (2001) S327-31.
- [42] F.J. Veith, S.K. Gupta, E. Ascer, S. White-Flores, R.H. Samson, L.A. Scher, J.B. Towne, V.M. Bernhard, P. Bonier, W.R. Flinn, Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions, *J Vasc Surg* 3(1) (1986) 104-14.
- [43] Y. Zhang, X.S. Li, A.G. Guex, S.S. Liu, E. Muller, R.I. Malini, H.J. Zhao, M. Rottmar, K. Maniura-Weber, R.M. Rossi, F. Spano, A compliant and biomimetic three-layered vascular graft for small blood vessels, *Biofabrication* 9(2) (2017) 025010.
- [44] F.E.M. Herrmann, P. Lamm, P. Wellmann, S. Milz, C. Hagl, G. Juchem, Autologous endothelialized vein allografts in coronary artery bypass surgery - Long term results, *Biomaterials* 212 (2019) 87-97.
- [45] A.J. Melchiorri, L.G. Bracaglia, L.K. Kimerer, N. Hibino, J.P. Fisher, In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor, *Tissue Eng Part C Methods* 22(7) (2016) 663-70.
- [46] H.F. Guo, W.W. Dai, D.H. Qian, Z.X. Qin, Y. Lei, X.Y. Hou, C. Wen, A simply prepared small-diameter artificial blood vessel that promotes in situ endothelialization, *Acta Biomater* 54 (2017) 107-116.
- [47] J.J. Glynn, M.T. Hinds, Endothelial outgrowth cells regulate coagulation, platelet accumulation, and respond to tumor necrosis factor similar to carotid endothelial cells, *Tissue Eng Part A* 21(1-2) (2015) 174-82.
- [48] R.F. Ankeny, M.T. Hinds, R.M. Nerem, Dynamic shear stress regulation of inflammatory and thrombotic pathways in baboon endothelial outgrowth cells, *Tissue Eng Part A* 19(13-14) (2013) 1573-82.
- [49] K.A. Ahmann, S.L. Johnson, R.P. Hebbel, R.T. Tranquillo, Shear stress responses of adult blood outgrowth endothelial cells seeded on bioartificial tissue, *Tissue Eng Part A* 17(19-20) (2011) 2511-21.
- [50] H.E. Achneck, R.M. Jamiolkowski, A.E. Jantzen, J.M. Haseltine, W.O. Lane, J.K. Huang, L.J. Galinat, M.J. Serpe, F.H. Lin, M. Li, A. Parikh, L. Ma, T. Chen, B. Sileshi, C.A. Milano, C.S. Wallace, T.V. Stabler, J.D. Allen, G.A. Truskey, J.H. Lawson, The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells: EPC-seeded antithrombotic Ti implants, *Biomaterials* 32(1) (2011) 10-8.

- [51] H. Bompais, J. Chagraoui, X. Canron, M. Crisan, X.H. Liu, A. Anjo, C. Tolla-Le Port, M. Leboeuf, P. Charbord, A. Bikfalvi, G. Uzan, Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells, *Blood* 103(7) (2004) 2577-84.
- [52] A. Gomez-Aristizabal, A. Keating, J.E. Davies, Mesenchymal stromal cells as supportive cells for hepatocytes, *Mol Ther* 17(9) (2009) 1504-8.
- [53] I.A. Potapova, G.R. Gaudette, P.R. Brink, R.B. Robinson, M.R. Rosen, I.S. Cohen, S.V. Doronin, Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro, *Stem Cells* 25(7) (2007) 1761-8.
- [54] T.O. Pedersen, A.L. Blois, Y. Xue, Z. Xing, Y. Sun, A. Finne-Wistrand, J.B. Lorens, I. Fristad, K.N. Leknes, K. Mustafa, Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation, *Stem Cell Res Ther* 5(1) (2014) 23.
- [55] D. Pfeiffer, K. Wankhammer, C. Stefanitsch, K. Hingerl, B. Huppertz, G. Dohr, G. Desoye, I. Lang, Amnion-derived mesenchymal stem cells improve viability of endothelial cells exposed to shear stress in ePTFE grafts, *Int J Artif Organs* 42(2) (2019) 80-87.
- [56] X. Ran, Z. Ye, M. Fu, Q. Wang, H. Wu, S. Lin, T. Yin, T. Hu, G. Wang, Design, Preparation, and Performance of a Novel Bilayer Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Graft, *Macromol Biosci* 19(3) (2019) e1800189.
- [57] A. Goins, V. Ramaswamy, D. Lichlyter, A. Webb, J.B. Allen, Fabrication of a bilayer graft for small diameter vascular applications, *J Biomed Mater Res A* 106(11) (2018) 2850-2862.
- [58] S. Asadpour, J. Ai, P. Davoudi, M. Ghorbani, M. Jalali Monfared, H. Ghanbari, In vitro physical and biological characterization of biodegradable elastic polyurethane containing ferulic acid for small-caliber vascular grafts, *Biomed Mater* 13(3) (2018) 035007.
- [59] X. Guo, J. Zhu, H. Zhang, Z. You, Y. Morsi, X. Mo, T. Zhu, Facile preparation of a controlled-release tubular graft for blood vessel implantation, *J Colloid Interface Sci* 539 (2019) 351-360.
- [60] E. Lopez-Ruiz, S. Venkateswaran, M. Peran, G. Jimenez, S. Pernagallo, J.J. Diaz-Mochon, O. Tura-Ceide, F. Arrebola, J. Melchor, J. Soto, G. Rus, P.J. Real, M. Diaz-Ricart, A. Conde-Gonzalez, M. Bradley, J.A. Marchal, Poly(ethylmethacrylate-co-diethylaminoethyl acrylate) coating improves endothelial repopulation, bio-mechanical and anti-thrombogenic properties of decellularized carotid arteries for blood vessel replacement, *Sci Rep* 7(1) (2017) 407.
- [61] O. Kaplan, T. Hierlemann, S. Krajewski, J. Kurz, M. Nevoralova, M. Houska, T. Riedel, Z. Riedelova, J. Zarubova, H.P. Wendel, E. Brynda, Low-thrombogenic fibrin-heparin coating promotes in vitro endothelialization, *J Biomed Mater Res A* 105(11) (2017) 2995-3005.
- [62] M. Meiring, M. Khemisi, L. Laker, P.M. Dohmen, F.E. Smit, Tissue Engineered Small Vessel Conduits - The Anti-Thrombotic Effect of Re-Endothelialization of Decellularized Baboon Arteries: A Preliminary Experimental Study, *Med Sci Monit Basic Res* 23 (2017) 344-351.
- [63] A. Post, A.P. Kishan, P. Diaz-Rodriguez, E. Tuzun, M. Hahn, E. Cosgriff-Hernandez, Introduction of sacrificial bonds to hydrogels to increase defect tolerance during suturing of multilayer vascular grafts, *Acta Biomater* 69 (2018) 313-322.
- [64] B.C. Isenberg, C. Williams, R.T. Tranquillo, Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents, *Ann Biomed Eng* 34(6) (2006) 971-85.

- [65] P.P. Hedeman Joosten, H.J. Verhagen, G.J. Heijnen-Snyder, T.J. van Vroonhoven, J.J. Sixma, P.G. de Groot, B.C. Eikelboom, Thrombogenesis of different cell types seeded on vascular grafts and studied under blood-flow conditions, *J Vasc Surg* 28(6) (1998) 1094-103.
- [66] B.J. Ballermann, A. Dardik, E. Eng, A. Liu, Shear stress and the endothelium, *Kidney Int Suppl* 67 (1998) S100-8.
- [67] S.K. Yazdani, B.W. Tillman, J.L. Berry, S. Soker, R.L. Geary, The fate of an endothelium layer after preconditioning, *J Vasc Surg* 51(1) (2010) 174-83.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eriselda Keshi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Konstruktion eines thromboresistenten Gefäßtransplantats mittels Dezellularisierung und Rezellularisierung für gefäßchirurgische Zwecke" [Construction of a thromboresistant tissue engineered vascular graft based on de- and recellularization] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Eriselda Keshi hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Eriselda Keshi, Peter Tang, Marie Weinhart, Hannah Everwien, Simon Moosburner, Nicolai Seiffert, Michael Lommel, Ulrich Kertzsch, Brigitta Globke, Anja Reutzel-Selke, Benjamin Strücker, Johann Pratschke, Igor Maximilian Sauer, Nils Haep, Karl Herbert Hillebrandt. **Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity.** JBiolEng 2021

Beitrag im Einzelnen: Alleinige Durchführung der Dezellularisierung und der Rezellularisierungsversuche. Alleinige Durchführung der Vollblutperfusionsversuche, gemeinsame Etablierung der Perfusionskreisläufe für die dynamische Kultivierung und für die Vollblutperfusion. Mithilfe bei der Isolierung der endothelialen Vorläuferzellen. Mithilfe bei der Auswertung der luminalen Endothelzellbedeckung und Entstehen von Abbildung 8. Mithilfe bei der histologischen Auswertung mit Anfertigung der Abbildungen 3, 5, 6, 7. Mithilfe bei der statistischen Auswertung der BGA-Daten mit Entstehung von Abbildung 4 und 6. Mithilfe bei der Berechnung der Wandschubspannung und Entstehung von Abbildung 2. Schreiben und Einreichen des Papers, Durchführung der Veränderungen des Manuskripts im Rahmen der Revision, Wiedereinreichen.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"BIOTECHNOLOGY and APPLIED MICROBIOLOGY"**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 159 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	41,989	84.694	0.048220
2	NATURE BIOTECHNOLOGY	78,786	54.908	0.145670
3	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY	20,693	19.536	0.018170
4	BIOTECHNOLOGY ADVANCES	23,792	14.227	0.017000
5	GENOME BIOLOGY	54,758	13.583	0.098990
6	MOLECULAR THERAPY	24,333	11.454	0.030250
7	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	69,561	10.618	0.075140
8	JOURNAL OF NANOBIOTECHNOLOGY	6,775	10.435	0.007010
9	PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL	13,143	9.803	0.018400
10	METABOLIC ENGINEERING	10,661	9.783	0.015260
11	CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY	18,835	9.740	0.019700
12	BIORESOURCE TECHNOLOGY	166,941	9.642	0.102960
13	GENOME RESEARCH	47,141	9.043	0.064690
14	Annual Review of Animal Biosciences	1,470	8.923	0.003280
15	CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY	5,631	8.429	0.006090
16	REVIEWS IN ENVIRONMENTAL SCIENCE AND BIO- TECHNOLOGY	3,762	8.044	0.002800
17	npj Biofilms and Microbiomes	1,282	7.290	0.003180
18	BIOINFORMATICS	149,362	6.937	0.155170
19	STEM CELLS	23,967	6.277	0.017860

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	Biotechnology for Biofuels	14,171	6.040	0.018670
21	CANCER GENE THERAPY	3,768	5.987	0.002720
22	Microbial Biotechnology	6,007	5.813	0.006990
23	GENOMICS	11,771	5.736	0.006800
24	HUMAN GENE THERAPY	7,074	5.695	0.006860
25	Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology	8,530	5.678	0.011380
26	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	4,185	5.657	0.003170
27	FOOD MICROBIOLOGY	15,020	5.516	0.011100
28	CYTOTHERAPY	7,694	5.414	0.006940
29	Microbial Cell Factories	10,869	5.328	0.012460
30	Nanomedicine	10,613	5.307	0.009140
31	Environmental Technology & Innovation	2,657	5.263	0.002660
32	GENE THERAPY	8,112	5.250	0.004130
33	Current Opinion in Chemical Engineering	2,795	5.163	0.003980
34	Advances in Applied Microbiology	2,246	5.086	0.001390
35	New Biotechnology	4,198	5.079	0.004590
36	BIOMASS & BIOENERGY	24,521	5.061	0.012580
37	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	54,507	4.813	0.036130
38	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY	118,391	4.792	0.042550
39	Synthetic and Systems Biotechnology	725	4.708	0.001650
40	Biotechnology Journal	7,684	4.677	0.009140
41	Probiotics and Antimicrobial Proteins	2,370	4.609	0.002340

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	Bioresources and Bioprocessing	1,325	4.578	0.002030
43	JOURNAL OF GENE MEDICINE	2,294	4.565	0.001380
44	BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING	28,276	4.530	0.014010
45	FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING	5,948	4.481	0.004610
46	Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts	9,686	4.401	0.012790
47	EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY	5,994	4.388	0.006110
48	Journal of Biological Engineering	1,732	4.355	0.002200
49	INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION	14,127	4.320	0.009380
50	Briefings in Functional Genomics	2,186	4.241	0.002850
51	MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS	13,703	4.171	0.006820
52	OncoTargets and Therapy	16,157	4.147	0.026210
53	Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr	4,226	4.102	0.003000
54	SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY	6,244	4.022	0.003460
55	BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL	13,222	3.978	0.008800
56	Fermentation-Basel	1,330	3.975	0.001840
57	BMC GENOMICS	51,069	3.969	0.066590
58	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6,852	3.963	0.008600
59	FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	2,994	3.918	0.001550
60	BIODEGRADATION	3,405	3.909	0.001080
61	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY	22,834	3.891	0.014780
62	JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY	25,277	3.772	0.011680

Druckexemplar der Publikation

Keshi et al. *Journal of Biological Engineering* (2021) 15:26
<https://doi.org/10.1186/s13036-021-00277-2>




Journal of
 Biological Engineering

RESEARCH

Open Access

Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity



Eriselda Keshi¹, Peter Tang¹, Marie Weinhart^{2,3,4}, Hannah Everwien¹, Simon Moosburner¹, Nicolai Seiffert¹, Michael Lommel⁵, Ulrich Kertzschner⁵, Brigitta Globke^{1,6}, Anja Reutzel-Selke¹, Benjamin Strücker⁷, Johann Pratschke^{1,2}, Igor Maximilian Sauer^{1,2*} , Nils Haep^{1,8†} and Karl Herbert Hillebrandt^{1,6†}

Abstract

Background: Since autologous veins are unavailable when needed in more than 20% of cases in vascular surgery, the production of personalized biological vascular grafts for implantation has become crucial. Surface modification of decellularized xenogeneic grafts with vascular cells to achieve physiological luminal coverage and eventually thromboresistance is an important prerequisite for implantation. However, ex vivo thrombogenicity testing remains a neglected area in the field of tissue engineering of vascular grafts due to a multifold of reasons.

Methods: After seeding decellularized bovine carotid arteries with human endothelial progenitor cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, luminal endothelial cell coverage (LECC) was correlated with glucose and lactate levels on the cell supernatant. Then a closed loop whole blood perfusion system was designed. Recellularized grafts with a LECC > 50% and decellularized vascular grafts were perfused with human whole blood for 2 h. Hemolysis and complete blood count evaluation was performed on an hourly basis, followed by histological and immunohistochemical analysis.

* Correspondence: igor.sauer@charite.de; <http://www.experimental-surgery.de>; <https://www.matters-of-activity.hu-berlin.de/en>

[†]Nils Haep and Karl Herbert Hillebrandt contributed equally to this work.

¹Department of Surgery, Campus Charité Mitte | Campus Vichow-Klinikum, Experimental Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

²Cluster of Excellence Matters of Activity, Image Space Material funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC 2025 – 390648296, Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Results: While whole blood perfusion of decellularized grafts significantly reduced platelet counts, platelet depletion from blood resulting from binding to re-endothelialized grafts was insignificant ($p = 0.7284$). Moreover, macroscopic evaluation revealed thrombus formation only in the lumen of unseeded grafts and histological characterization revealed lack of CD41 positive platelets in recellularized grafts, thus confirming their thromboresistance.

Conclusion: In the present study we were able to demonstrate the effect of surface modification of vascular grafts in their thromboresistance in an ex vivo whole blood perfusion system. To our knowledge, this is the first study to expose engineered vascular grafts to human whole blood, recirculating at high flow rates, immediately after seeding.

Keywords: Decellularization, Recellularization, Bypass, Vascular graft

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) affects the majority of the adult population over the age of 60, with an estimated annual mortality of 17.3 million deaths worldwide [1, 2]. It is the leading cause of peripheral vascular disease and requires percutaneous transluminal angioplasty (PTA) or bypass surgery to avoid complications such as critical limb ischemia and amputation [3]. Bypass surgery demands a biocompatible, strong, and non-thrombogenic vascular graft (VG), but autologous vascular grafts, the current gold standard, are not feasible in more than 20% of the patients [4, 5]. Prosthetic grafts have been widely implemented after *DeBakey* established the clinical usefulness of grafts made of *Dacron* (a fiber made of polyester polyethylene terephthalate) in 1950 and *ePTFE* (expanded polytetrafluorethylene) grafts two decades later [6]. However, complications such as intimal hyperplasia, calcification, thrombotic occlusion, high infection rates and biomechanical mismatch have hampered their success, especially when substituting small-diameter blood vessels [7–9].

In recent years there has been growing interest in *tissue engineering* (TE) for repurposing organs and tissues, among them vascular grafts [10]. Studies have demonstrated the crucial role of a functional luminal endothelium: it not only prevents thrombus formation within tissue engineered vascular grafts (TEVG), but also prevents intimal hyperplasia through nitric oxide released by these cells [11]. A recent meta-analysis, in which the authors found that acellular TEVG showed a lower patency rate than recellularized grafts draws attention to the importance of recellularization, surface modification, and preconditioning in achieving and maintaining superior graft patency rates [12]. Mature endothelial cells (EC) of human or xenogenous origin have been used for reconstruction of the luminal endothelial monolayer [13]. However, isolation of EC involves an invasive procedure and therefore cannot be used by default for TEVG construction [13]. Endothelial progenitor cells (ECPC) show qualities of EC upon exposure to

physiological shear stress and can be isolated from the peripheral blood through routine venipuncture [14]. Moreover, ECPC isolated from peripheral blood of patients with multiple comorbidities can be used to engineer autologous VG with decreased need for immunosuppression and show a more optimal seeding efficiency when co-cultivated with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hMSC) [15]. Contact of blood with artificial biomaterials or with – in a pathophysiological context – exposed ECM activates thrombotic and inflammatory reactions [16]. Successful restoration of the endothelial lining significantly lowers thrombogenicity, a severe complication that can lead to graft failure and need for re-intervention [17, 18]. EC play an important role in mediating and impeding thrombosis through interaction via various mechanisms with platelets and leukocytes [17]. Despite widely acknowledged importance, ex vivo thrombogenicity testing is a challenging, and neglected area in the field of tissue engineering of vascular grafts [18–20]. Dynamic whole blood perfusion experimental setups are indispensable, since they correctly recapitulate the dynamics of thrombosis, but are associated with a high degree of complexity and experimental sophistication [18]. The optimal experimental setup must fulfill three main requirements: 1) Provision of flow to mimic physiological conditions that occur during thrombus formation, which might cause detachment of endothelial cells from the thrombogenic luminal surface and consequently modify the results. The implemented flow also affects the endpoint selection. 2) Whole blood as perfusion fluid and the optimal amount of anticoagulant substances. 3) It requires a balance between the surface area of the tissue engineered construct seeded with endothelial cells and the thrombogenic surface area of the connecting tubes, which is especially difficult to achieve in an ex vivo whole blood perfusion setup [18].

In the present study we mainly investigated the thrombogenic benefits of surface modification of decellularized bovine carotid arteries in an ex vivo closed loop

whole blood perfusion system. We first humanized the luminal surface of the grafts by co-seeding them with hECPC derived from surgical patients and with human umbilical cord-derived MSC (hMSC). We compared two recellularization protocols and implemented daily measurements of glucose and lactate levels as **R2.3** indicators of cell proliferation, cell death, and luminal endothelial cell coverage (LECC). Based on previous results by Ott et al., showing a 54% LECC of the pulmonary vasculature of a rat lung allowing successful orthotopic transplantation, we aimed for a LECC of greater than 50% [17]. Lastly, we perfused decellularized and recellularized vascular grafts with human whole blood in an ex vivo perfusion system and compared hemolysis values and complete blood count parameters at three different time points. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the antithrombotic impact of humanization of decellularized xenogeneic vascular grafts in an ex vivo dynamic whole blood perfusion (WBP) experimental setup.

Methods

Decellularization of bovine carotid arteries (dBCA)

The bovine carotid arteries were harvested from cows from a local abattoir. The animals were terminated and halved. At the time of harvesting, the carotid arteries on both sides of the neck were already exposed. Within a short time, the arteries were carefully and sharply dissected together with the surrounding tissue. Finally the vessels were rinsed in ice cold phosphate buffered saline (PBS, Biochrom, Berlin, Germany) to remove any blood remnants and transported back to the laboratory on ice. There, surplus tissue was removed and the arteries were further dissected into segments of 6–10 cm and stored in -80°C until further use. We approximately harvested a total of 100 carotid arteries, which had an internal diameter between 0.5 and 0.7 cm and a length of 6 cm. The decellularization protocol has been previously described [15]. Briefly, arteries were washed in double-distilled water at 4°C in two cycles of 24 h each and later subjected to three cycles of 24 h each of enzymatic digestion (2 h of treatment with 0.05% Trypsin in 0.02% EDTA in PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), agitation in a detergent solution (4 h of treatment with Triton X-100 0.1%, Roth, Karlsruhe, Germany) and DNase digestion (2 h of treatment with DNase-I, 8 mg/mL, Roche Diagnostics, Risch, Switzerland) at 37°C . In between cycles, samples were washed in PBS. Lastly, grafts were kept in sterile PBS supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) at 4°C until use.

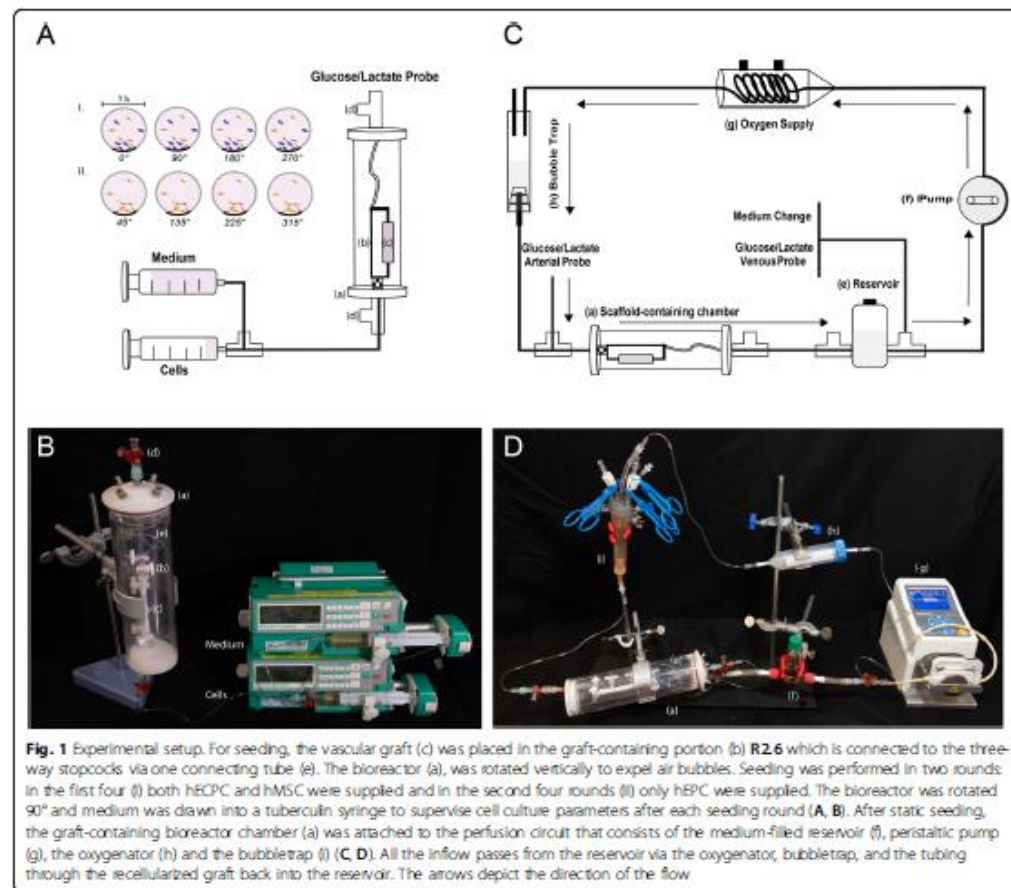
Cell isolation, expansion and culture

Approval for isolation of hECPC from peripheral blood of patients being treated in the Department of Surgery,

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany was given by the local ethical board (*Ethikkommission der Charité*, EA2/123/10). Informed consent from all patients enrolled in this study was present prior to venipuncture. hECPC and hMSC were used for recellularization. Isolation of hECPC was performed from a total of 8 patients (50% female), according to the protocol established in our previous study [15], briefly peripheral blood was obtained and blood samples were heparinized. Mononuclear cells were isolated using Biocoll (Biochrom) density gradient centrifugation and the suspension was plated on fibronectin-gelatin-coating and incubated at 37°C and 5% CO_2 for 4 days with EBM-2 medium. Afterwards, all non-adherent cells were washed off with PBS, a new EGM-2 medium was added, changed daily for 1 week and then every other day. The mean age of the patients was 50 ± 13.5 years. 50% of these were diagnosed with a malignant disease, 25% with an autoimmune disorder, and 25% with other diseases (Supplementary Table 1). The cells were expanded and cultured in *Endothelial Growth Medium*, composed of EBM-2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Biochrom GmbH, Berlin, Germany), *SupplementMix* (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany), 500 U/mL penicillin and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (both Biochrom GmbH, Berlin, Germany) on 0.02% gelatin-coated plates (0.2 mg/ml Gelatin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and used within passages 3 to 6. hMSC were purchased from ATCC (Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells, PCS-400-030, ATCC / LGC Standards; Wesel, Germany) and cultured in Dulbecco's Medium (DMEM, 1 g/L glucose; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biochrom GmbH, Berlin, Germany), 500 U/ml penicillin, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (both Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and 1% glutamine (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and used within passages 3 to 7. All cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany).

Dynamic seeding and static culture of hECPC and hMSC

Prior to seeding, we sterilized decellularized bovine carotid arteries (dBCA) in 0.02% peracetic acid (PAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 4% ethanol (EtOH) for 6 h at 4°C , washed them in PBS until pH value was physiological (7.3–7.4) and soaked them in fresh EGM-2 overnight. A perfusion chamber that permits dynamic seeding, static culture, and dynamic culture was developed (Fig. 1A, B). The chamber consists of a custom-made bioreactor (a), in which the graft-containing portion (b) was placed between the two main inlets and connected to two three-way stopcocks (d) via one connecting tube. To seed dBCA, a 48-h protocol



consisting of 8 × 3-h cell-seeding rounds and overnight static incubation was established. First, the components of the graft-containing chamber were assembled in a sterile culture hood. The graft (c) was embedded in the graft-containing portion of the chamber, filled with culture medium, and put in a 37 °C incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany). In the first four rounds, hECPC and hMSC were pooled and injected simultaneously using a syringe pump at a flow rate of 40 ml/h. Thereafter, cells were washed in PBS, trypsinized for 5 min, centrifuged at 300 × g for 5 min, and resuspended in the respective media. In total a density of $(22.51 \pm 19.75) \times 10^6$ ECPC and $(12.07 \pm 9.86) \times 10^6$ MSC was supplied. Finally the cells were pooled and collected in a 2:1 ratio in a 20 ml syringe. EGM-2 and DMEM 1:1 mixture was used for flushing the connecting loops after cell seeding. Cell

seeding was carefully performed in a laminar air flow hood using a syringe pump at a rate of 40 ml/h to avoid detachment of the previously seeded cells. The graft-containing chamber was transferred to the 37 °C incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany), and cells were allowed to attach horizontally for 3 h. The chamber was connected to the oxygenation tubing (95% oxygen, 5% carbon-dioxide; DASGIP MX4/4, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Germany) and was rotated by 45° (longitudinal axis) each round. In the last four rounds, only hECPC were used, and the seeding was performed similarly. After each round, 0.5 ml culture medium was collected from the bioreactor for blood gas analysis (BGA) and parameters were evaluated with the standard ABL 800 analyzer (Radiometer, Copenhagen, Denmark) to monitor cell viability/proliferation.

Flow dynamics and shear stress measurement

We calculated the shear stress the graft wall was subjected to at different flow rates during the dynamic cultivation of 10 days and during the whole blood perfusion. The investigations of the flow field were performed using the commercial CFD software STAR-CCM+ (CD-Adapco, Melville, New York), which uses a finite volume approach. The computational domain was discretized using polyhedrons in the main flow section with a base size of 0.2 mm and prismatic elements forming 12 inflatable layers on the walls for a high resolution of the wall gradients. The power quality criteria were kept within the range recommended by the STAR-CCM+ guidelines. A vessel with a diameter of 6 mm and a length of 60 mm was simulated. To ensure that the flow was fully developed, an inflow area was added in front of the vessel. The resulting mesh consists of 691,482 cells. The gradients in the flow field were discretized using the Hybrid Gauss LSQ method. A viscosity of 0.6913 mPa*s was assumed for the nutrient solution according to Huber et al. [21]. The density of blood was assumed to be 1.058 g/cm³ and for the shear dependent viscosity the Carreau-Yasuda model with the parameters described by Abraham et al. [22] was used. The Reynolds number was estimated at 61 for the nutrient solution and 3.5 for whole blood. Due to the low Reynolds numbers, a laminar, steady flow with constant density was assumed. Mesh independence was achieved by refining the mesh until the change in the target value of the wall shear stress was below 1%.

Dynamic culture of Recellularized grafts

After the first 24 h of static culture, the graft-containing chamber was connected to the perfusion system. The reservoir bottle was filled with 50 ml culture medium (EGM-2: DMEM in a 1:1 ratio) and the system was flushed to eliminate air before the graft-containing chamber was embedded and the bioreactor was transferred to the incubator (Fig 1C, D). Cells were then allowed to rest quasi-statically on the luminal surface of the dBCA for 24 h before encountering pertinent flow. During this period, the culture medium was pumped at a slow flow rate of 0.3 ml/min. The next day, perfusion started at an initial flow rate of 0.6 ml/min, which was gradually elevated to 6 ml/min and 8 ml/min over 10 ($n = 8$) and 14 ($n = 5$) days. We aimed to subject hECPC to gradually increasing shear stress, while simultaneously maintaining optimal medium flow to supply all cells with nutrients. Daily replacement of half of the culture medium, control of cell viability/proliferation parameters, and graft rotation of 45° ensued. In total, 13 recellularization experiments were performed. Of those, five were dynamically cultivated over 14 days. However, the first set of analysis of cell culture parameters and

endothelial coverage revealed superiority of 10-day perfusion over 14-day perfusion. Hence, 10 days dynamic culture was applied in the rest of the experiments ($n = 8$). One representative experiment was terminated after the 24 h dynamic seeding ($n = 1$).

Histological and Immunohistochemical analysis

First, histological and immunohistochemical characterization of the dBCA was performed: The decellularized grafts were fixed in paraformaldehyde (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Germany) for 24 h, dehydrated with an upcoming series of alcohol, and finally embedded in paraffin (Sigma-Aldrich / Merck, Darmstadt, Germany). The paraffin blocks were then sectioned at 5 μm thickness and stained with hematoxylin and eosin (H&E, Applichem, Darmstadt, Germany). Moreover, to confirm the preserved microanatomy of the dBCA, staining was performed with Rabbit polyclonal Anti-Laminin antibody diluted 1:50 (Abcam, Berlin, Germany, cat.no. ab11575), Rabbit polyclonal Anti-Collagen I antibody (Abcam, cat.no. ab6308) diluted 1:400 and Rabbit polyclonal Anti-Collagen IV antibody (Abcam, cat.no. ab6586) in 1:400 dilution. For immunohistochemical staining, 0.01 M citrate buffer was used for antigen retrieval (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and 3% goat serum for blocking (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

The recellularized grafts were processed as mentioned above and the paraffin blocks were then sectioned at 5 μm thickness and stained with hematoxylin and eosin (H&E, Applichem, Darmstadt, Germany). ECPC were stained with Rabbit monoclonal Anti-CD34 (Abcam, cat.no. ab110643) diluted 1:100, Rabbit Anti-CD31 antibody (Bioss Antibodies Inc., Woburn, USA, cat. no. bs-0195R) diluted 1:100, Rabbit Anti-eNOS (Abcam, cat.no. ab5589) diluted 1:100 and Rabbit anti-von Willebrand Factor antibody (Abcam, cat. no. ab6994) diluted 1:50. hMSCs were stained with Rabbit monoclonal CD90 antibody (Abcam, cat. no. ab52625) diluted 1:100. Secondary goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594, ab150080) was diluted 1:400. Dako LSAB2 System-HRP (Agilent Technologies, Cat #K0675) and 3,3'-diaminobenzidine (Agilent Technologies) were used for visualization. Sections were mounted with Permount Medium (Aquatex, Merck, Darmstadt, Germany). Images were taken with a Zeiss Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Evaluation of accuracy of glucose and lactate as indicators of luminal coverage

At the end of the dynamic culture, estimated luminal endothelial cell coverage (LECC) based on the H&E staining of all vascular grafts was calculated. Paraffin sections from the left, middle and right portion of the graft

were evaluated independently and the results were given in percentage (%). The mean coverage in percent of all three sections and the mean of the calculated percentage of the two separate evaluators was taken as the final LECC. In total, 13 experiments were evaluated. Seven of these were sole recellularization experiments, and six were the recellularized TEVG perfused with whole blood. Furthermore, we investigated the correlation between glucose and lactate on the day before finalization of the experiment with the calculated luminal coverage ($n = 13$). Finally, the sensitivity, specificity and Youden's index were calculated to investigate performance of glucose as an indicator of LECC > 60%, the receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted, and its area was determined.

Designing and heparin coating of the whole blood perfusion system

The perfusion setup used during recellularization was adapted for use in our ex vivo whole blood perfusion experiments. In addition to lowering the tubing of the flow circuit to a minimum, heparin coating to further decrease thrombogenicity was performed according to a previously established protocol [23]. Briefly, the perfusion system was first statically incubated with the polymeric amine polyallylamine (0.25 mg/mL, Corline Systems AB, Uppsala, Sweden) dissolved in sodium borate buffer (250 mM, pH 9) for 15 min. Afterwards, a surface bound electrostatic complex was formed by incubation with a solution of a macromolecular conjugate of heparin (Corline Heparin Conjugate, 0.1 mg/mL; Corline Biomedical, Uppsala, Sweden) in sodium acetate buffer (0.1 M, 0.5 M NaCl, pH 4) for 60 min. After each step, the perfusion system was rinsed three times using Milli Q water. The same procedure was repeated one more time. The system was then incubated in sodium borate buffer (250 mM, pH 9) for 15 min to remove excess conjugate. Lastly, incubation in acetic anhydride solution (0.1% in 250 mM Na borate buffer, pH 10.5) for 10 min to block residual amino groups followed. All steps were performed at room temperature. If not immediately perfused, the whole blood perfusion system was filled with PBS and stored at 4 °C.

Ex vivo whole blood perfusion of vascular grafts

Blood was drawn from six healthy volunteers aged between 18 and 65 years old with no known immunodeficiency, hereditary disease, or chronic organ dysfunction. Approval was given by the local ethical board (Ethikkommission der Charité, EA1/073/20), and informed consent was obtained from the donors.

First, the whole blood perfusion of the unseeded and seeded grafts was prepared: While the perfusion system was coated with heparin using the protocol mentioned

above, a 20 mL syringe that would later be used to draw the blood was simultaneously filled with 20 μ l heparin (100 U) and incubated at 37 °C for 1 h. Finally, the perfusion system was constructed. When the system and the unseeded TEVG were perfused, either the connecting tubes of both sides of the perfusion system were attached to each other or the decellularized bovine carotid artery was embedded into the perfusion system. If whole blood perfusion of the seeded graft immediately after seeding was performed, the recellularized TEVG was embedded into the system together with the TEVG-containing portion of the perfusion system. Fresh 20 mL whole blood was drawn from the donors into the previously heparinized plastic syringe and into one ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) prepared sample tube. The latter served as the pre-perfusion control (\emptyset). After gentle shaking in the syringe, blood was dispensed to the system, and loops were flushed at a rate of 6 ml/min, the same flow rate applied during the 10-day conditioning period. The blood-containing reservoir was placed on a shaker and continuously shaken at 90 rpm. The VG-containing portion of the system was placed in a dish filled with previously warmed PBS to prevent drying out of the graft. The perfusion time was set at 2 h. Hemolysis evaluation via BGA (ABL 800 analyzer, Radiometer, Copenhagen, Denmark) to monitor cell viability/proliferation and collection of EDTA probes was performed for each donor separately at three time-points: before perfusion (t 0), 1 hour (t 1), and 2 hours (t 2) after perfusion. The collected probes were immediately sent to the laboratory (Labor Berlin, Charité-Vivantes GmbH, Berlin, Germany). To demonstrate the difference between seeded and unseeded VG, blood was drawn at three separate times from each donor and complete blood count parameters at three different time points were compared: a) WBP of connecting loops (w/o TEVG, $n = 6$) b) WBP of decellularized grafts (dTEVG, $n = 6$); c) WBP of recellularized grafts (rTEVG, $n = 6$).

Histological and immunohistochemical analysis of vascular grafts after WBP

After WBP the graft was shortly immersed in previously warmed Ringer solution (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany) to remove residual blood and subsequently fixed in paraformaldehyde (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Germany) for 24 h, dehydrated with an upcoming series of alcohol and finally embedded in paraffin (Sigma-Aldrich). The paraffin blocks were then sectioned at 5 μ m thickness, stained with H&E (Applchem, Darmstadt, Germany) and LECC was calculated. Furthermore, we performed the same immunohistochemical stainings for hECPC and hMSC.

To histologically evaluate thromboresistance of seeded grafts and thrombogenicity of unseeded ones

decellularized and recellularized whole blood perfused grafts were stained with Rabbit polyclonal *anti-CD41* antibody (Abcam Cat: ab63983) in a 1:400 dilution. Before incubating with the primary antibody, tissue slices were blocked with Serum-Free Protein Block (Agilent Technologies, Dako X0909) and Avidin/Biotin (ThermoFischer Scientific). Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594, Abcam Cat: ab150080) diluted 1:400 was used as a secondary antibody. The CD41 staining revealed multiple cell nuclei attached to the luminal surface of the decellularized vascular grafts. To further investigate this finding, histological staining with H&E and immunohistological staining with Rabbit *anti-CD31* antibody (Bioss Antibodies Inc., Woburn, USA, cat. no. bs-0195R) diluted 1:100 and Mouse *anti-CD45* antibody (Clone X16/99, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) diluted 1:100 was performed. For staining with *anti-CD45* antibody, Pro Taq Antibody diluent (BioCyc GmbH, Potsdam, Germany) was used. Finally, sections were mounted with *Permount Medium* (Aquatex, Merck, Darmstadt, Germany). Images were taken with a *Zeiss Axio Observer.Z1* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Bioburden analysis

We performed bioburden analysis following each experiment to confirm absence of contamination. To achieve that, 5 ml culture medium was mixed with 7 ml SOC (Super Optimal Broth with Catabolite Repression) medium and incubated for 24, 48, 72, and 96 h at 37 °C and 150 RPM. SOC/Sputum mixture was used as the positive control. Absorbance was measured at 425 and 600 nm using NanoDrop 2000 C Uv-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). SOC/PBS mixture was used as a blank.

Statistical analysis

All data were analyzed and visualized using GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California USA). Gaussian Distribution was calculated using the Shapiro-Wilk normality test. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Ordinary One-Way ANOVA (data with Gaussian Distribution) followed by Tukey's Multiple Comparison Test or Kruskal-Wallis Test (data without Gaussian Distribution) followed by Dunn's Multiple Comparison Test was performed to compare cell culture parameters. ROC analysis was performed to determine the sensitivity and specificity of glucose as an indicator of LECC and the cut-off value was determined using the Youden Index. Student's paired t-test was performed to compare between arterial and venous BGAs. Pearson's correlation coefficient (r) or nonparametric Spearman's correlation coefficient were used to investigate the association between BGA parameters and histological evaluation. Data

is presented as 95% confidence interval (CI). A p -value of less than 0.05 was considered significant.

Results

1.1. Wall Shear Stress in the Simulated Dynamic Cultivation and WBP Model

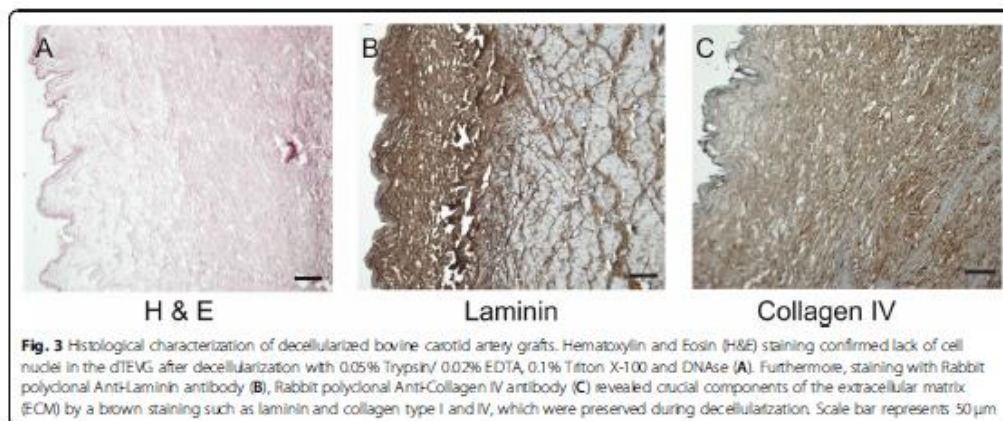
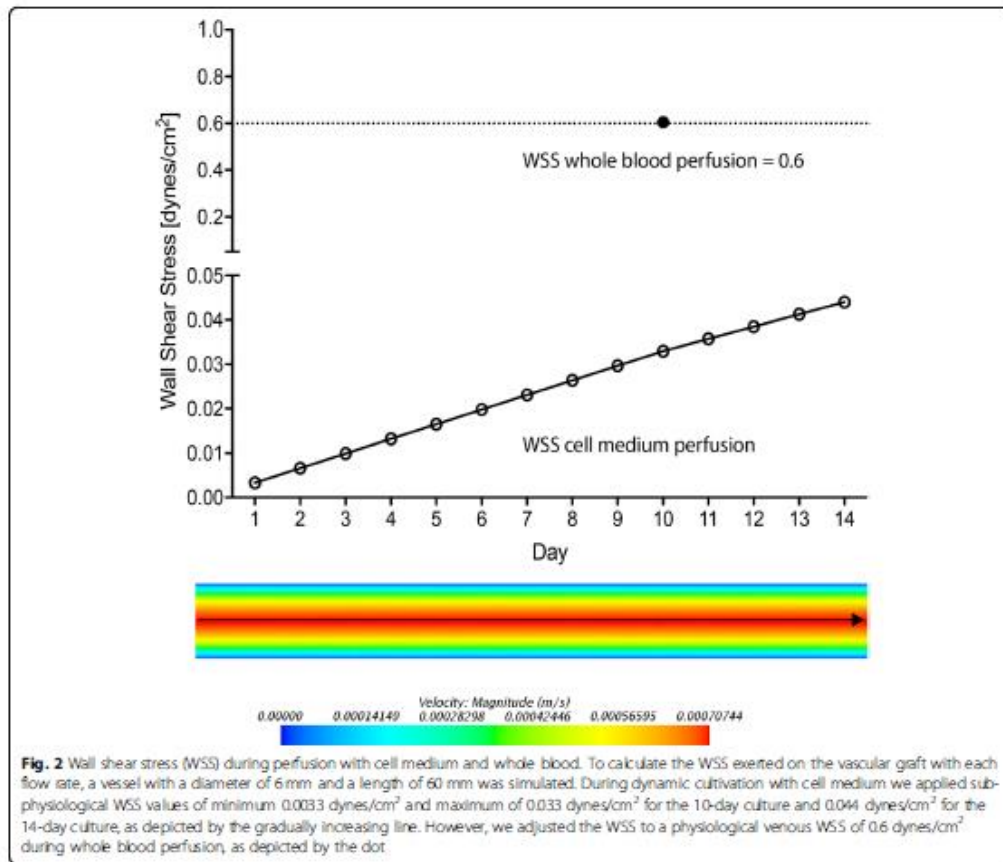
We measured the wall shear stress (WSS) exerted on the vascular graft during the dynamic cultivation using a simulation setup. Aiming to supply cells with nutrients in a continuous manner, without skipping any regions and to avoid cell detachment due to abruptly increasing flow rates we chose to supply the vascular grafts with a sub-physiological shear stress during the dynamic cultivation with cell medium. The maximal flow velocity in our simulated vascular graft was registered in the central part of the vascular lumen at a value of 0.0007 m/s (Fig. 2). We applied an initial shear stress of 0.0033 dynes/cm², which we gradually elevated to 0.0330 dynes/cm² during the 10-day cultivation and to 0.0440 dynes/cm² during the 14-day cultivation (Fig. 2). Nonetheless, we aimed at physiological venous shear stress when perfusing with whole blood for 2 h and adjusted the wall shear stress during this time to 0.6 dynes/cm² (Fig. 2). Importantly, aiming for an arterial WSS during whole blood perfusion would lead to very high hemolysis rates within a very short amount of time, as it can be seen occurred within 2 h during WBP under venous WSS.

Confirmation of Decellularization

We decellularized tubular bovine carotid arteries with an internal diameter of 0.5–0.7 cm and an approximate length of 6 cm. In the experimental work preceding the current one we performed an extensive comparison for different stainings between native and decellularized bovine carotid arteries, and thus did not repeat here [15]. Moreover, in the same work we performed an extensive biochemical and mechanical characterization of the dBCA [15]. In the current study we could show that the vascular grafts preserved their macroscopic integrity throughout the decellularization process. The H&E staining of the grafts revealed lack of residual cellular structures, thus confirming efficient decellularization (Fig. 3A). Moreover, immunohistochemical staining with Laminin and Collagen IV antibodies revealed preserved graft microanatomy (Fig. 3 B, C).

Cell viability and proliferation during seeding and static culture

To monitor cell viability and cell culture stability BGA parameters were measured every 3 h during the 24-h seeding period (t3, t6, t9, t12, t15, t18, t21, t24). While pH, pO₂, pCO₂, Na⁺ and K⁺ were used as indicators of



cell culture stability, glucose and lactate served as indicators of cell proliferation and viability.

The pH gradually decreased between t3 and t24 of cultivation and showed a statistically significant change at all time points (t3 vs. t24: 7.50 ± 0.22 vs. 6.92 ± 0.14 , $p < 0.0001$, Fig. 4A). pO_2 remained stable throughout all time points (t3 vs. t24: 234.85 ± 44.70 vs. 230.153 ± 45.42 mmHg, $p = 0.8280$, Fig. 4B). However, pCO_2 behaved differently, showing significantly increasing levels (t3 vs. t24: 18.46 ± 5.87 vs. 36.51 ± 9.31 mmHg, $p < 0.0001$, Fig. 4C).

Although glucose concentration remained constant during the first three time-points (t3 vs. t9: 86.54 ± 17.04 vs. 58.62 ± 19.28 mg/dL, $p = 0.6565$), it continuously decreased after each cellular injection showing a statistically significant difference between the first and last injection, and all time-points after t9 (t3 vs. t24: 86.54 ± 17.04 vs. 31.46 ± 16.78 mg/dL, $p < 0.0001$, Fig. 4D). In contrast lactate gradually increased, showing an insignificant change only during the first 3 h of static cultivation (t3 vs. t6: 22.38 ± 8.57 vs. 36.23 ± 11.84 mg/dL, $p = 0.3649$; t3 vs. t24: 22.38 ± 8.57 vs. 85 ± 17.59 mg/dL, $p <$

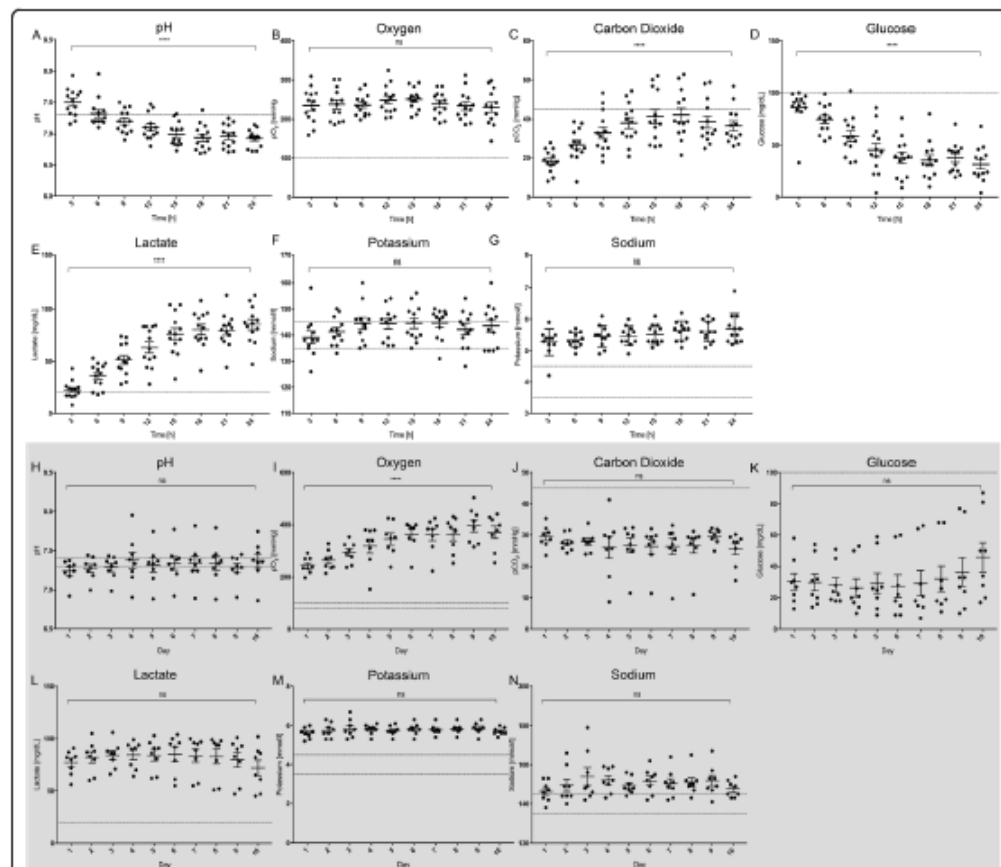


Fig. 4 Cell culture parameters during seeding, static cultivation and dynamic culture. Parameters during static cultivation: Supervision of pH during static cultivation every three hours revealed the values gradually decreased (A). While pO_2 values maintained stable (B), pCO_2 values significantly rose (C). Glucose (D) and lactate (E) values respectively decremented and incremented significantly during the static cultivation, while Na^+ (F) and K^+ (G) concentrations preserved stability throughout its duration. (***, $p < 0.0001$). Parameters during dynamic cultivation: pH which preserved stability (H), pO_2 , which significantly incremented presumably due to increasing flow rates (I) and pCO_2 (J), glucose (K), lactate (L), Na^+ (M) and K^+ (N) which also preserved stability throughout the whole duration of the dynamic culture. (***, $p < 0.0001$). The dots represent different experiments

0.0001, Fig. 4E). Moreover, no significant correlation could be detected between glucose and lactate, and between lactate and carbon dioxide (data not shown). These results indicate ongoing cellular activity inside the VG and were also monitored during dynamic cultivation to indicate luminal endothelial coverage. These results indicate ongoing cellular activity inside the VG and were also monitored during dynamic cultivation to indicate luminal endothelial coverage. Furthermore, both sodium (Na^+) and potassium (K^+) ion concentrations remained stable during the whole reseeding process (Na^+ , t3 vs t24: 139.09 ± 7.99 vs. 143.50 ± 8.32 mmol/L, $p = 0.5005$, Fig. 4F; K^+ , t3 vs. t24: 5.27 ± 0.42 vs. 5.70 ± 0.48 mmol/L, $p = 0.0611$, Fig. 4G).

Cell viability and proliferation during dynamic culture

During dynamic perfusion, both arterial (afferent of the graft) and venous (efferent of the graft) BGA parameters were evaluated. However, since no significant differences were found between the two, we chose the values of the venous BGA for the rest of the analysis.

To find the optimal duration for dynamic cultivation 14-day ($n = 5$) and 10-day ($n = 8$) perfusion protocols were compared. Although most parameters were comparable with both protocols (Supplementary Fig. 1A), glucose and lactate gradually shifted to baseline levels towards the end of the perfusion in the 14-day protocol, strongly suggesting cell detachment (Supplementary Fig. 1B). This implication is in agreement with the inferior average LECC of these grafts, which was estimated as $33\% \pm 34.2\%$ from the evaluation of stained tissue slices. Detailed analysis of the data revealed a **R2.5** minimal, statistically not significant rise of glucose levels from day 10 to day 14, a finding that marks day 10 as the turning point in cell viability inside the graft (d10 vs. d14: 70.00 ± 26.01 vs. 80.80 ± 14.81 mg/dL, $p > 0.9999$, Supplementary Fig. 1B). Based on these data, we implemented a 10-day ex vivo dynamic cultivation protocol for our further experiments ($n = 8$). Of note, the apparent lack of correlation between glucose and lactate on day 14 and the estimated LECC can be attributed to the low sample size (glucose: $r = -0.5$, CI: -0.9635 to 0.6523 , $p = 0.346$; lactate: $r = 0.7550$, CI: -3.82 to 0.98 , $p = 0.14$, Supplementary Fig. 1C). pH mainly remained physiological and stable during the whole 10-day perfusion period ($p > 0.999$, Fig. 4H). Despite a statistically significant increase in pO_2 when comparing levels on day 1 with all other time points, which can be explained by the increase in flow rate, pO_2 and pCO_2 preserved their stability Fig. 4I, J). Importantly, both glucose and lactate remained stable throughout perfusion, implying that cells did not overgrow or detach inside the graft (glucose, d1 vs. d10: 28.13 ± 12.82 mg/dL vs. 45.88 ± 26.52 mg/dL, $p > 0.9999$, Fig. 4K; lactate, d1 vs. d10:

77.13 ± 11.67 mg/dL vs. 72.00 ± 20.62 mg/dL, $p > 0.9999$, Fig. 4L). As expected, sodium and potassium ion concentrations behaved similarly (Fig. 4M, N).

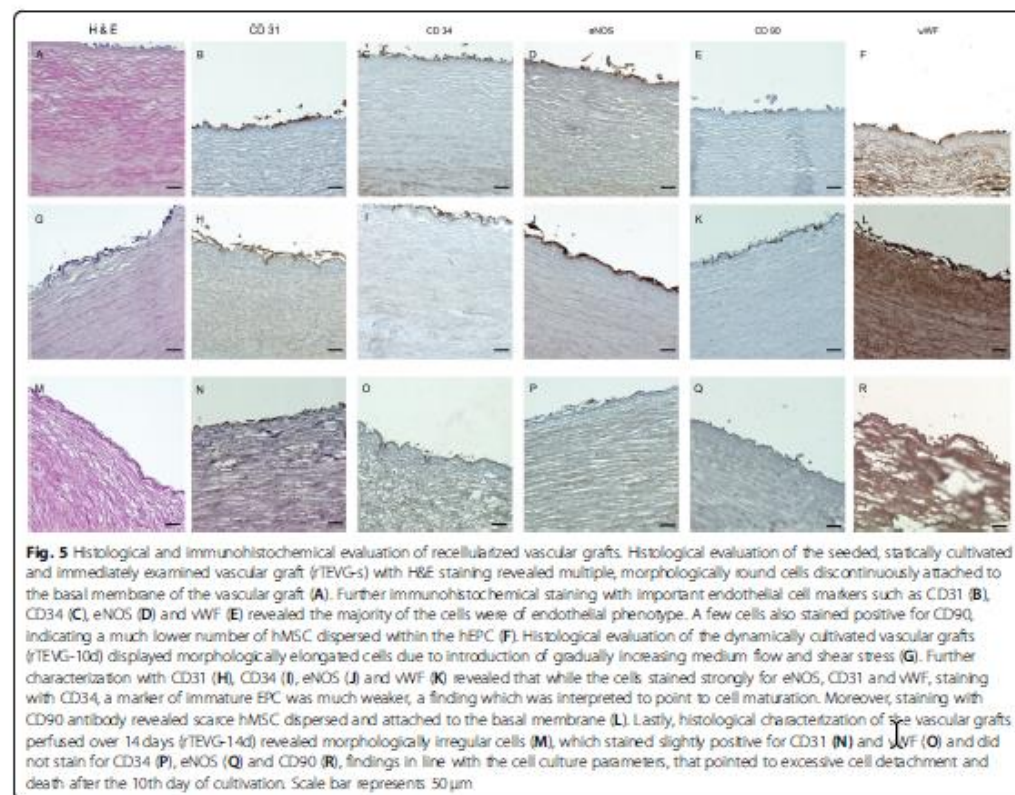
dBCA supports growth of hECPC and hMSC

We performed histological and immunohistochemical staining of the statically cultivated (rTEVG) and 10-day (dTEVG-10d) and 14-day (dTEVG-14d) dynamically cultivated TEVG.

One representative experiment was finalized after 24-h seeding and static cultivation. Histological staining of this graft revealed intact, morphologically round cells mostly tightly attached to the luminal surface of the basal membrane (Fig. 5A). Immunohistochemical staining for CD31, CD34, eNOS and vWF confirmed the endothelial origin of the majority of these cells (Fig. 5B, C, D, E). Moreover, the staining revealed few CD90-positive hMSC irregularly arranged within the hECPC (Fig. 5F). As expected, lack of flow and shear stress accounted for both the round cellular morphology and for the numerous cell clumps located within the lumen of the TEVG (data not shown). On the other hand, H&E staining of the 10-day dynamically cultivated VG revealed an intima repopulated with a morphologically flat, continuous, tightly attached cellular monolayer (Fig. 5G). As staining for CD31, CD34, eNOS and vWF confirmed, the majority of the cells were of endothelial phenotype (Fig. 5H, I, J, K). Moreover, it appears the physiological shear stress accounted for a maturation of hMSC into endothelial cells, as suggested by the decline in CD90 positive cells (Fig. 5L). Finally, histological staining of the 14-day dynamically cultivated VG, revealed flatter cell morphology than the 10-day perfused VG. As predicted, this cellular monolayer appeared to be rather discontinuous, confirming the cell detachment earlier implied by the BGA parameters (Fig. 5M, N, O, P, Q). Importantly, significantly fewer cells stained positive for CD90 in this group (Fig. 5R).

Endothelial seeding reduces ex vivo thrombogenicity of vascular grafts

Dynamic venous flow rate whole blood perfusion experiments were performed to test thromboresistance of recellularized VG, as opposed to unseeded VG in a modified dynamic perfusion system (Fig. 6A). As already stated, a low dose heparinization of the whole blood (5 U/ml) was performed prior to perfusion. Platelet count evaluation was selected as the endpoint. To assess the extent of mechanical trauma and hemolysis, potassium and oxygen levels were evaluated at three different time points during the two-hour perfusion, both of which rose in a statistically significant manner in all three groups, as demonstrated in Fig. 6B, C. Although high potassium levels in accordance with considerable

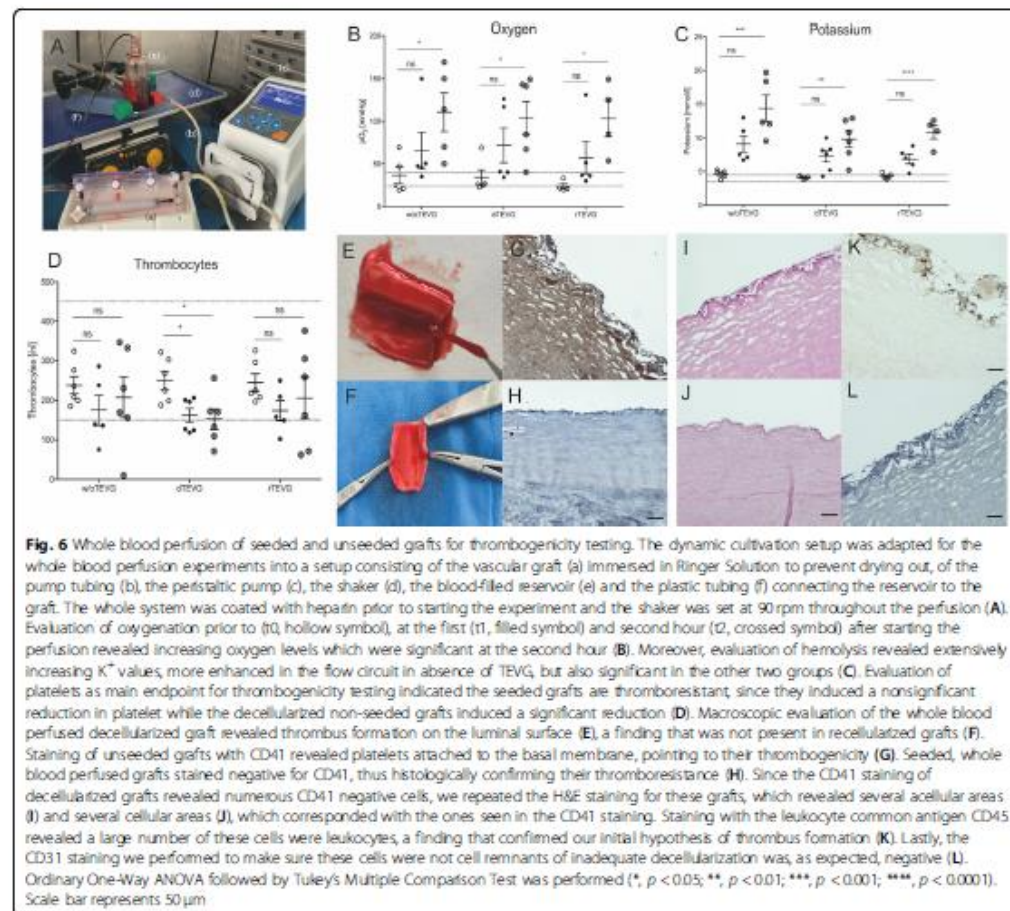


hemolysis were expected in graft absence, (w/o TEVG; t0 vs. t2: 4.66 ± 0.60 mmol/L vs. 14.40 ± 4.41 mmol/L, $p = 0.0007$), the other two groups also showed a significant increase of potassium levels, as displayed in Fig. 6C (dTEVG; t0 vs. t2: 4.12 ± 0.23 vs. 9.78 ± 2.96 , $p = 0.0020$ mmol/L, rTEVG; t0 vs. t2: 4.3 ± 0.4 vs. 10.85 ± 2.072 , $p < 0.0001$).

Most importantly, we evaluated platelet levels and extent of depletion prior to, 1 h, and 2 h after perfusion with whole recirculating blood. Circuit blockage did not occur in any of the experiments. No significant difference in platelet counts was identified after the first and second hour in absence of the graft, confirming the successful heparin coating and the feasibility of the perfusion system for further thrombogenicity studies (w/o TEVG; t0 vs. t2: 238.16 ± 52.91 n/nL vs. 207.33 ± 125.20 n/nL, $p = 0.8363$, Fig. 6D). As expected, perfusion of the dTEVG with whole blood revealed significantly reduced platelet counts at both the first and the second hour (dTEVG; t0 vs. t1: 250.66 ± 55.21 vs. 162 ± 42.93 , $p = 0.0333$; t0 vs. t2: 250.66 ± 55.21 vs. 152 ± 63.79 , $p =$

0.0179 , Fig. 6D), while platelet depletion caused by the perfusion of the reendothelialized graft was insignificant (rTEVG; t0 vs. t2: 245.00 ± 52.85 vs. 205.33 ± 128.38 , $p = 0.7284$, Fig. 6D).

Thromboresistance of recellularized grafts could also be demonstrated via representative images of the luminal surface of de- and recellularized grafts after WBP. These images reveal macroscopic thrombus formation in the lumen of unseeded grafts, but not in the lumen of seeded grafts (Fig. 6E, F). Of note, while macroscopic thrombus formation was not consistently present, microscopic thrombus was seen in all decellularized, whole blood perfused grafts. The cells attached at the luminal surface of these grafts stained positive for CD41, confirming their platelet identity. Importantly, the staining revealed lack of CD41 positive cells in recellularized TEVG, thus demonstrating their thromboresistance (Fig. 6G, H). Importantly, while staining for CD41 we noticed some CD41-negative cells that stained blue, but not brown (Fig. 6G). The H&E staining of decellularized whole blood perfused grafts also revealed acellular (Fig.



6l) and cellular (Fig. 6) regions in the basal membrane, a finding in line with the CD41-negative cells seen in Fig. 6G. To further investigate their origin, the cells were stained with the leukocyte common antigen, which revealed multiple CD45 positive cells (Fig. 6K). These findings suggest the thrombus remained attached to the luminal surface of the decellularized grafts even after slight perfusion with Ringer solution. Moreover, staining with anti-CD31 antibody was negative, confirming these cells were not EC, and thus not remnants of an ineffective decellularization (Fig. 6L). The difference in color between the figures is related to the brightness settings in the microscope. In conclusion, while seeded grafts did not show macroscopic or microscopic thrombus formation, the unseeded decellularized grafts revealed multiple blood cells attached to the luminal surface in a

discontinuous manner, some of which were identified to be thrombocytes and leukocytes via CD41 and CD45 staining respectively.

Whole blood perfusion did not affect integrity of reconstructed endothelial monolayer

Cell dislodgement is an important concern regarding ex vivo whole blood perfusion setups. Therefore, we performed histological and immunohistochemical analysis to evaluate the integrity of the endothelial monolayer and endothelial coverage of the grafts after perfusion. When assessing the stained tissue slices, we detected various grades of detachment of the monolayer from the intima, as it can be seen in Fig. 7. However, this was also the case in the recellularized grafts considered for calculation of the LECC. We hypothesized it was an artifact

caused by sectioning of the paraffin blocks. Although detached from the luminal surface in some slices, histological staining with H&E revealed an intact cellular coverage of the intima (Fig. 7A). The morphology of CD31, CD34, vWF and eNOS positive hECPC and CD90 positive hMSC was similar to the non-perfused recellularized VG (Fig. 7B - F). Importantly, the mean luminal coverage of the whole blood perfused TEVG ($n = 6$) was estimated to be $61 \pm 5\%$. Lastly, when assessing the stained tissue slices, we detected various grades of detachment of the monolayer from the intima, which was especially visible in 10 out of 43 sections. We hypothesized it was an artifact caused by sectioning of the paraffin blocks.

Glucose consumption and lactate production as indicators of luminal coverage

We evaluated the LECC of 13 recellularized grafts dynamically cultivated over 10 and 14 days. As mentioned above, the estimated LECC of the 14 day perfused grafts was $33 \pm 34.2\%$, while the mean LECC of the 10 day perfused grafts was $61.25 \pm 9.10\%$, whereby the highest was 74% and the lowest 47%. We first investigated the potential of final glucose levels of the static culture to be used as non-invasive indicators of luminal coverage. We hypothesized they would not be an effective indicator, since subjection to long term high shear stress would ultimately cause detachment of formerly attached cells. As expected, no significant correlation was found between glucose levels of the 24 h sample (before dynamic perfusion) and luminal coverage ($R^2 = 0.2111$, 95% CI: -0.8063 to 0.1226 , $p = 0.1142$, Fig. 8A). However, glucose levels on the day prior to finalization of the dynamic cultivation proved to be a more suited indicator. The correlation analysis revealed a statistically significant indirect correlation ($R^2 = 0.4877$, $r = -0.6983$, 95% CI: -0.9022 to -0.2395 , $p = 0.0079$, Fig. 8B), showing that low glucose levels on the day before finalization of the experiment correlate with an improved LECC and can be used as a reliable non-invasive indicator of luminal coverage of the graft. The same analysis was performed

for lactate production for both, static and dynamic culture. While the first correlation was statistically insignificant ($R^2 = 0.152$, $r = 0.3898$, 95% CI: -0.2053 to 0.7745 , $p = 0.1879$, Fig. 8C), the latter revealed a statistically significant direct correlation to luminal coverage ($R^2 = 0.5328$, $r = 0.73$, 95% CI: 0.2994 to 0.9135 , $p = 0.0046$, Fig. 8D). Glucose levels lower than 62 mg/dL demonstrated the best efficacy for indicating $LC > 60\%$, with a 100% sensitivity and 87.5% specificity (Youden's Index = 0.8571). The area under the curve, as calculated from the ROC analysis, was 0.9643 (CI: 0.8716 – 1.057 , $p = 0.0053$, Fig. 8E).

Bioburden analysis

We compared the absorbance of the dynamic culture supernatant (culture medium + SOC, $n = 13$) to the absorbance of the positive control (culture medium + SOC + sputum, $n = 3$) after 24, 48, 72 and 96 h of dynamic incubation. The positive control showed constant contamination at all time points and at both 425 and 600 nm, while no contamination was detected in our experimental setup (Fig. 8F and G, $p < 0.0001$ at all time points).

Discussion

Decisive progress regarding the availability of vascular grafts in vascular surgery in case of unavailable autologous grafts is urgently needed [6, 7]. Here we test and demonstrate the ex vivo thromboresistance of biological tissue engineered vascular grafts (TEVG) based on de- and recellularization by perfusing them with human whole blood over 2 h. **R2.2** Based on a retrospective clinical study, out of all revascularization procedures performed due to peripheral artery disease, a graft was urgently needed only in 5% of the cases [24]. Recellularizing a TEVG with autologous cells that previously need to be expanded and then dynamically conditioned in the graft for long periods of time is not appropriate for this clinical scenario. However, in most of the cases the disease develops gradually, and there are many screening methods that can be employed in low-risk and high-risk

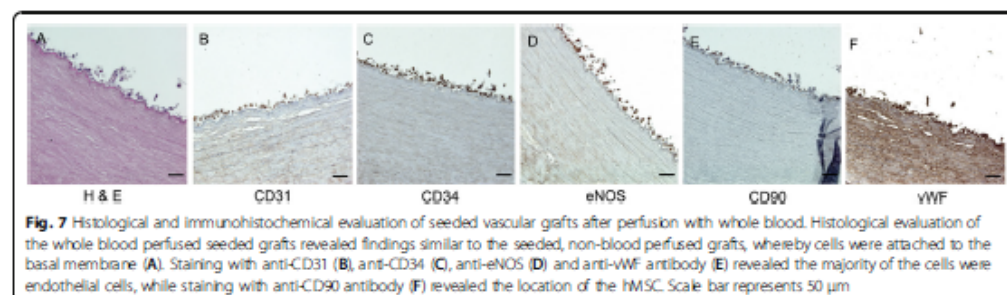
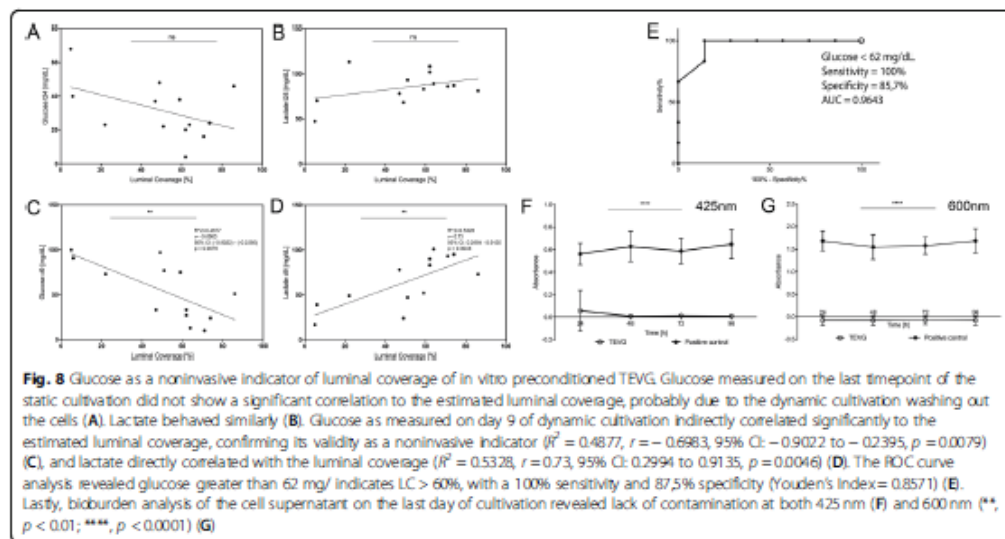


Fig. 7 Histological and immunohistochemical evaluation of seeded vascular grafts after perfusion with whole blood. Histological evaluation of the whole blood perfused seeded grafts revealed findings similar to the seeded, non-blood perfused grafts, whereby cells were attached to the basal membrane (A). Staining with anti-CD31 (B), anti-CD34 (C), anti-eNOS (D) and anti-vWF antibody (E) revealed the majority of the cells were endothelial cells, while staining with anti-CD90 antibody (F) revealed the location of the hMSC. Scale bar represents 50 μm



patients [25]. Thus, in many primary cases with chronic disease or cases with failure of the acutely implanted graft, there is some time available to develop the construct. We hypothesize that in these cases the isolation of the autologous cells would immediately follow at the time of diagnosis, and the surgery would be scheduled to fit the time span required for the construction of the TEVG. Finally, the implantation could be performed.

Reconstruction of the endothelial lining is decisive for long-term patency of TEVG in vivo [26–29]. However, a consensus on the most optimal way to perform cell seeding is absent [4]. Meinhart et al. reported that in vitro seeded ePTFE grafts perform significantly better than non-seeded synthetic grafts and show comparable patency to autologous venous grafts (64.4% vs. 68%) [30–32]. Our present study provides further insight into the topic of in vitro seeding of VG by discussing the efficacy, advantages and limitations associated with this approach. Endothelial cells are the main players in intima reconstruction [33–36]. An important 20-year-long clinical study by Herrmann et al. implemented autologous EC isolated from patient-specific vein segments to reendothelialize decellularized VG, an invasive procedure that subjected patients to additional hospitalization-associated risks such as multidrug resistant infections [37]. ECPCs have emerged as a more advantageous alternative to mature EC since they can be isolated from peripheral blood via routine venipuncture [38, 39]. Moreover, it is possible to construct an autologous VG using ECPC isolated from patients with multiple cardiovascular or other morbidities [15]. Indeed, several other

important studies such as those performed R2.4 by Hinds et al. [40, 41], Tranquillo et al. [42], and Truskey et al. [43] have implemented late-outgrowth endothelial progenitor cells in TEVG construction and subsequent biocompatibility evaluation. Herein we successfully used hECPC isolated from eight patients with various comorbidities to reconstruct the endothelial monolayer of dBCA grafts. Our immunohistochemical analysis revealed the seeded cells stained positive not only for ECPC markers, such as CD34, but also for mature EC markers, such as CD31, vWF, and eNOS (Fig. 5 A–L), corroborating with studies reporting that ECPC express mature EC markers when subjected to physiological shear stress and long-term culture [44]. Moreover, many authors report that MSC increases EC viability through the release of paracrine factors, an effect that is further enhanced under physiological shear stress [45–48]. Based on the data gathered in these studies and the data published by our group [15], we co-cultivated hEPC with hMSC derived from the umbilical cord. However, these cells are not an option when personalized TEVG are aimed. Although traditionally the bone marrow has been the most important source of MSC in humans [49], over time alternative sources such as the adipose tissue [50, 51], the salivary gland [52], and dental tissue [53] among others have also been identified [54, 55]. Especially the adipose tissue has become a very promising tissue source for allogeneic hMSC and tissue engineering, because the isolation involves only a minimally invasive procedure without major morbidities and long hospitalization. Thus, the viability of the results presented here needs to

be explored with further studies where both cells are isolated from the same patient.

The in vivo performance of tissue engineered vascular grafts upon implantation depends mostly on the optimal ex vivo conditioning preceding the implantation. One of the most important aspects of optimal preconditioning is the supplementation of physiological flow and shear stress to avoid cell detachment upon encounter with blood flow and shear stress in vivo [56]. Physiological wall shear stress (WSS) values range from 10 to 16 dynes/cm² for large diameter arteries (0.3 cm) and 18–26 dynes/cm² for small diameter arteries (0.1–0.06 cm) [56, 57]. On the other side, the great saphenous vein registers physiological shear stress of 0.2 dynes/cm² and a non-pulsatile flow [58]. In the present study we purposely subjected the vascular grafts to a subphysiological WSS of 0.033 dynes/cm² during the dynamic culture, and then adjusted to physiological venous WSS of 0.6 dynes/cm² during WBP (Fig. 2B). The gradually increasing shear stress achieved in the current study accounted for a histologically visible change in cell morphology and prepared the cells for the physiological shear stress they were subjected to during ex vivo WBP experiments, as demonstrated by the preserved luminal coverage. An implantation of these TEVG would subject the ECPC to abruptly changing arterial shear stress varying from less than 1 dynes/cm² to 600 dynes/cm² [59, 60], hypothetically leading to cell detachment. Unfortunately, it is extremely challenging to achieve more physiological arterial flow rates and shear stress in ex vivo perfusion conditions, rendering implantation experiments indispensable [61]. Indeed, our calculations show that to achieve physiological arterial WSS values while cultivating cells with cell medium, approximate flow rates ranging from 860 ml/min to 1460 ml/min are required, which translates into either abruptly increasing high flow rates with the risk of cell detachment [56] or slowly increasing flow rates over exceedingly long-term culture periods, which also leads to cell detachment (Fig. 5 M-R). Moreover, the composition of the perfusion system may also have an effect on conditioning, maturation, proliferation and functionality of the seeded cells. Indeed, the presence of a medium-containing reservoir, connecting tubes and three-way stopcocks in the perfusion system accounts for disrupted and turbulent flow. On the other side, although the peristaltic pump exerts pulsatile flow that imitates blood flow in the body, it also accounts for high mechanical trauma and extensive hemolysis. All in all, although we were able to achieve some physiological conditions for the dynamic cultivation of our TEVG, the ex vivo environment is not ideal, and the preliminary short-term conditioning that is possible within these conditions must be followed-up by an implantation.

Successful in vitro engineering of vascular grafts requires a dependable method that enables continuous noninvasive supervision of cell culture conditions and extent of cell viability, detachment or overgrowth [62, 63]. Despite some variations, our method is in line with that used by Carrier et al. in a study published in 1999 [64]. We implemented glucose uptake and lactate production as non-invasive indicators of cell proliferation and viability, and pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, and K⁺ as indicators of cell culture stability. Regular measurement during the static seeding revealed gradually decreasing glucose levels associated with a significant increase in lactate and pCO₂ and a significant decrease in pH (Fig. 4). While the gradual increase in pCO₂ during static cultivation of our grafts could be explained by the Krebs cycle involved in aerobic glycolysis, the anaerobic glycolysis that occurs at insufficient oxygen levels could be the reason behind the increase in lactic acid, both generating low pH [65]. We interpreted the absence of these changes during the dynamic culture to indicate cell culture stability, lack of cell overgrowth and lack of cell detachment. The most striking result emerging from this data is the significant indirect correlation between final glucose levels of dynamic culture and the estimated percentage in luminal coverage, confirming glucose levels can be implemented as reference markers to indicate endothelial coverage of VG (Fig. 8 C, D). This lends support to previous findings in the literature, where glucose consumption rate (GCR) was used as an indicator of growth of endothelial cells and as predictor of in vivo performance [66]. In our view, the average 61% coverage estimated after selectively perfusing grafts with a predicted LECC >60% with whole blood confirms and emphasizes the validity of our model. Importantly, the lack of correlation between static cultivation parameters and estimated LECC can be attributed to the fact that long-term dynamic culture and gradually increasing flow rates wash out a considerable amount of cells, even under low venous shear stress (Fig. 8A, B). As expected, similar findings applied to final average lactate levels, which directly correlated to percentage of LECC. Importantly, we tested the correlation between glucose and lactate levels and the LECC of the grafts on day 14; this correlation resulted insignificant (Supplementary Fig. 1C).

Graft thrombogenicity due to incomplete luminal re-endothelialization is an important concern in vascular tissue engineering. Therefore it is imperative to investigate the anti-thrombogenic properties of seeded grafts ex vivo. Unfortunately, several bottlenecks stand in the way of designing an accurate experimental setup for this purpose [18]. Due to the previously mentioned logistical difficulties, many researchers have shied away from long-term high shear stress whole blood perfusion setups and focused on alternative investigation methods

[36, 67–70]. However, others have tried to recapitulate whole blood flow conditions, either through shaking [71] or through exposure to dynamic blood flow using a variety of methods, such as the Baumgartner assay [72–76]. Despite the mentioned difficulties, we tried to optimally recapitulate the physiological conditions the VG would be subjected to upon implantation by perfusing preconditioned VG over 2 h with slightly heparinized human whole blood recirculating at venous shear stress in a closed-loop perfusion system. During the duration of this study two main aspects of whole blood perfusion needed to be established and were especially challenging: the duration of the perfusion and the endpoint selection. We limited the perfusion time at 2 h due to hemolysis, an inevitable event that points to mechanical trauma arising from high shear stress perfusion systems involving peristaltic pumps. K^+ levels measured to evaluate the extent of this phenomenon in our setup revealed the hemolysis gradually increased over time, and as expected, was overall significantly more enhanced in the group without TEVG (Fig. 6C). However, pO_2 evaluated at three time-points revealed a lack of hypoxia, which is also known to cause extensive hemolysis [77] (Fig. 6B). Prior to this, we aimed to use intravascular pressure increase due to thrombus formation as the main endpoint, but this was not possible since relevant thrombus formation required very long perfusion times up to 20 h, which was associated with extreme hemolysis.

In whole blood thrombogenicity measurements endpoint selection is crucial and should be based on the flow regime and the surfaces being compared. References from the literature suggest that high flow rate thrombogenicity studies generate the most significant differences between seeded and unseeded surfaces [18, 78]. Based on this principle, we implemented thrombocyte counts as the main endpoint to assess thromboresistance in our study. After multiple attempts, this endpoint was in agreement with the flow profile we implemented, was logistically effective and allowed us to correctly evaluate the relevance of our hypothesis. As mentioned above, we also modified the perfusion time accordingly, so that the duration did not lead to extensive cell death and hemolysis. The most conspicuous observation to emerge from the data comparison is the insignificant platelet depletion induced by the seeded vascular grafts compared to the significant depletion in unseeded TEVG, a result that has further strengthened our confidence in the vast advantages of in vitro recellularization. However, the expected significant platelet depletion both at the first and the second hour of whole blood perfusion of dTEVG is also noteworthy, since it provides further evidence for the widely acknowledged immediate thrombogenicity of exposed ECM [18]. To our knowledge, this is the first time the

thromboresistance of a newly reendothelialized, biological and potentially autologous TEVG is tested in an ex vivo, long term, high flow perfusion system with human whole blood. Our values are consistent with a study by Kaplan et al., where a significant decrease in platelets after whole blood perfusion of uncoated PVC foils was reported, whereas perfusion of fibrinogen/heparin-coated foils did not cause a significant change [73]. Nevertheless, in contradiction with our findings, they reported insignificant changes also in other CBC parameters, such as white blood cells, hemoglobin, hematocrit, and red blood cells [73]. Although hematocrit, hemoglobin, and erythrocyte depletion were insignificant during perfusion of our seeded grafts, perfusion of unseeded grafts as well as the flow circuit itself in absence of a graft induced a significant decrease in all three parameters (Suppl. Fig. 2 A-C). Also different from the mentioned study, our results show an extensive significant depletion of white blood cells in all three groups (Suppl. Fig. 2D). The foremost cause of these discrepancies may be the considerable mechanical trauma associated with the high shear stress and use of a peristaltic pump in our study. Indeed, these factors are absent in the mentioned study, where blood flow inside the Chandler's Loop is provided via rotation at 30 RPM, accounting for minimal mechanical stress to the cells [73].

In conclusion, this study confirms ex vivo thromboresistance of biological tissue-engineered vascular grafts preconditioned with human vascular cells. To the best of our knowledge, this is the first study to expose engineered vascular grafts to human whole blood recirculating at high flow rates. The findings indicate platelet depletion during perfusion of unseeded grafts was significantly higher when compared to the minor decrease caused by perfusion of seeded grafts. Besides confirming the stability of the reconstructed endothelial monolayer by reporting a preserved luminal coverage of more than 50% even after perfusion with whole blood, we could also demonstrate glucose as a non-invasive indicator of the graft endothelial coverage.

Experimental limitations

The present study entails several experimental constraints, which can be classified into limitations related to in vitro preconditioning and limitations related to thrombogenicity assessment using whole blood in an ex vivo setup. Despite studies acknowledging its advantages, in vitro preconditioning remains labor-intensive, which is why this approach has lost popularity. Moreover, achieving 100% luminal coverage is a challenge and requires very high cell counts. Since studies have shown considerable recellularization also occurs post-implantation in situ and also taking as a reference a study performed by Ott et al. [17] we aimed at a

coverage greater than 50% and achieved an average coverage of 60%. However, a long-term evaluation of response to various luminal coverage grades after implantation is required for an objective assessment. Moreover, we were unable to expose the recellularized TEVG to a physiological arterial shear stress that varies from less than 1 dynes/cm² to 600 dynes/cm² [59, 60], but only exposed them to sub-physiological shear stress during seeding and cultivation and venous shear stress during perfusion with whole blood. Indeed, flow rates ranging from 860 ml/min to 1460 ml/min translate into either abruptly increasing flow or slowly increasing flow over exceedingly long-term culture periods, which both lead to cell detachment. Lastly, when assessing the stained tissue slices, we detected various grades of detachment of the monolayer from the intima, which was especially visible in 10 out of 43 sections. We hypothesized it was an artifact caused by sectioning of the paraffin blocks.

The results of *ex vivo* whole blood perfusion experiments can be influenced by various experimental constraints [79]. The tubes constituting the flow system unavoidably provoke CBC changes unrelated to the vascular graft. Increasing the surface area of the tested graft in relation to that of connectors or coating the connecting tubes with heparin are feasible alternatives to isolate graft-specific thrombogenicity. Unfortunately, the surface area of the connectors required for our dynamic WBP setup exceeds that of our TEVG. Thus, we coated the flow circuit with heparin and evaluated thrombogenicity in absence of the graft. Importantly, we did not evaluate if the coating of the tubing further heparinized the blood. Although the impact could be irrelevant considering we implemented thrombocytes as our endpoint, this could be done by comparing clotting times before and after injection into the circuit via thromboelastography or aPTT. Secondly, inter-donor variability also impacts thrombogenicity experiments. Although platelet depletion patterns were mostly similar, the standard deviation reveals few inconsistencies, which could theoretically be resolved by repeating the experiments using blood from only one donor or pooled whole blood with matching blood group. Lastly, the bovine carotid arteries and their varying macro-architecture may have contributed to the inconsistencies in macroscopic thrombus formation on the luminal surface of the TEVG.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00277-2>.

Additional file 1: Supplementary Fig. 1. Cell culture parameters during the 14-day dynamic cultivation of seeded grafts. Daily supervision of cell culture parameters such as pH, pO₂, pCO₂, Na⁺ and K⁺ during the 14-day perfusion revealed mainly stable values similar to the 10-day dynamic cultivation (A). Daily supervision of glucose and lactate revealed

initially decreasing glucose and increasing lactate levels, which then slowly started to return to initial levels after the 10th perfusion day (B). The correlation analysis between glucose on day 14 and estimated luminal coverage after 14-day perfusion resulted insignificant ($r = -0.5417$, 95% CI = -0.6535 to 0.6523, $p = 0.2935$, as did the correlation between lactate and luminal coverage ($r = 0.7548$, 95% CI = -0.3815 to 0.9827, $p = 0.5698$, (*, $p < 0.05$) (C).

Additional file 2: Supplementary Fig. 2. Evaluation of complete blood count parameters after whole blood perfusion of seeded and unseeded grafts for thrombogenicity testing. Supervision of the white blood cells revealed an extensive significant depletion in all three groups (A). Although hematocrit (B), hemoglobin (C), and erythrocyte (D) depletion was insignificant during perfusion of our seeded grafts, perfusion of unseeded grafts and of the flow circuit in absence of a graft induced a significant decrease in all three parameters. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Additional file 3: Supplementary Table 1. Detailed characteristics of patients from whom hEPC isolation was performed. The mean age of the patients was 50 years old. 50% of the patients were diagnosed with malignancy, 25% with autoimmune disorders, and 25% with other diseases.

Acknowledgments

This work was supported by the BMWi (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie) project KF2852504CS4. Hannah Everwien was a *BH-Medical Doctoral Research* scholarship holder funded by the Charité – Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health. Dr. Karl Hillebrandt and Dr. Simon Moosbumer are participants in the BIH-Charité Junior Clinician Scientist Program funded by the Charité – Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health. Priv.-Doz. Dr. Struelker was participant in the BIH-Charité Clinician Scientist Program funded by the Charité – Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health. The author acknowledges the support of the Cluster of Excellence «Matters of Activity, Image Space Materials» funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC 2025–390/648296.

Authors' contributions

E.K. performed the experiments, the biochemical, histological and statistical analysis and wrote the manuscript. P.T. helped during all parts of the project and proofread the manuscript. M.W. helped during all parts of the project and proofread the manuscript. S.M. performed the statistical evaluation and proofread the manuscript. N.S. helped with cell cultivation and expansion, helped with establishing the experimental protocols and proofread the manuscript. M.L. helped during shear stress measurement and data analysis and proofread the manuscript. U.K. supervised and helped with data analysis and shear stress measurement and proofread the manuscript. B.G. helped establishing the idea, during the whole part of the project and proofread the manuscript. A.R.-S. discussed results with us, performed the statistical evaluation and proofread the manuscript. B.S. helped in developing the project idea and proofread the manuscript. J.P. discussed the results and proofread the manuscript. I.M.S. developed the project idea, discussed the results, proofread the manuscript and is the guarantor of this study. N.H. developed the project idea, supervised the whole project and contributed to the manuscript. K.H.H. was involved during all parts of the project, discussed the results and proofread the manuscript. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Blood was drawn from six healthy volunteers aged between 18 and 65 years old with no known immunodeficiency, hereditary disease, or chronic organ

dysfunction. Approval was given by the local ethical board (Ethikkommission der Charité, EA1/073/20), and informed consent was obtained from the donors.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Surgery, Campus Charité Mitte | Campus Vichow-Klinikum, Experimental Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ²Cluster of Excellence Matters of Activity, Image Space Material funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC 2025 – 390648296, Berlin, Germany. ³Institute of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Takustz 3, 14195 Berlin, Germany. ⁴Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany. ⁵Institute for Cardiovascular Computer-Assisted Medicine, Biofluid Mechanics Lab, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ⁶Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany. ⁷Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Universitätsklinikum Münster, Münster, Germany. ⁸Department of Pathology, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, USA.

Received: 9 July 2021 Accepted: 13 October 2021

Published online: 24 November 2021

References

- Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M, et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*. 2015;132(17):1667–78. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720>.
- Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, Drozda JP Jr, Sakkir F, Wilson SR, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(25 Suppl):S1–49. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.002>.
- Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA task force on practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease); endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic inter-society consensus; and vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006;113(11):e463–654. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174526>.
- Li S, Sengupta D, Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2014;6(1):61–76. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1246>.
- Faries PL, Leger FW, Arora S, Hook S, Pulling MC, Albari CM, et al. A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: all-autogenous conduit versus prosthetic grafts. *J Vasc Surg*. 2000;32(6):1080–90. <https://doi.org/10.1067/mva.2000.111279>.
- Zdravica RJ. Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art. *J Biomater Appl*. 1996;10(4):309–29. <https://doi.org/10.1177/088532829601000402>.
- Beigmeister H, Seydova N, Schreiber C, Strobl M, Grasl C, Walter I, et al. Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *Acta Biomater*. 2015;11:104–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.003>.
- Kirkton RD, Pritchard HL, Santiago-Maysonet M, Nilsson LE, Lawson JH, Dahl SLM. Susceptibility of ePTFE vascular grafts and bioengineered human acellular vessels to infection. *J Surg Res*. 2018;221:143–51. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.08.035>.
- Abutaleb NO, Truskey GA. Human iPSCs stretch to improve tissue-engineered vascular grafts. *Cell Stem Cell*. 2020;26(2):136–7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.011>.
- Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N, Keshi E, Pratschke J, Sauer IM. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int*. 2019;32(6):571–85. <https://doi.org/10.1111/tri.13462>.
- Patel SD, Waltham M, Wadood A, Burnard KG, Smith A. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4(2):129–41. <https://doi.org/10.1177/1753944710362903>.
- Slovinski I, Harvald EB, Juul Belling H, Jørgensen CD, Lindholt JS, Andersen DC. Concise review: patency of small-diameter tissue-engineered vascular grafts: a Meta-analysis of predelinical trials. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(7):671–80. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0287>.
- Chen X, Chen B, Yang Y, Zhou Y, Liu F, Gai M, et al. Isolation, culture and identification of human umbilical vein endothelial cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2016;32(3):328–31.
- Garikipati VNS, Kishore R. Endothelial progenitor cells: procedure for cell isolation and applications. *Methods Mol Biol*. 2017;1553:85–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8_7.
- Seiffert N, Tang P, Keshi E, Reutzel-Selke A, Moosburner S, Everwien H, et al. In vitro recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells. *J Biol Eng*. 2021;15(1):15. <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00266-5>.
- Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Haraszti S, et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*. 2010;31(9):2549–54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.088>.
- Ren X, Moser PT, Gilpin SE, Okamoto T, Wu T, Tapias LF, et al. Engineering pulmonary vasculature in decellularized rat and human lungs. *Nat Biotechnol*. 2015;33(10):1097–102. <https://doi.org/10.1038/nbt.3354>.
- McGuigan AP, Seldon MW. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials*. 2007;28(16):2547–71. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.039>.
- Weber M, Steinle H, Golombek S, Hamm L, Schliensak C, Wendel HP, et al. Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:99. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00099>.
- Banz Y, Cung T, Korchagina EY, Bovin NV, Haeblerl A, Rieben R. Endothelial cell protection and complement inhibition in xenotransplantation: a novel in vitro model using whole blood. *Xenotransplantation*. 2005;12(6):434–43. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00239.x>.
- Huber ML, Perkins RA, Laesicke A, Friend DG. New International Formulation for the Viscosity of H₂O. *J Phys Chem Ref Data*. 2009;101.
- Abraham F, Behr M, Heinkenschloss M. Shape optimization in steady blood flow: a numerical study of non-Newtonian effects. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2005;8(2):127–37. <https://doi.org/10.1080/10255840500180799>.
- Leijon J, Carlsson F, Bannstrom J, Sanchez J, Larsson R, Nilsson B, et al. Attachment of flexible heparin chains to gelatin grafts improves endothelial cell infiltration. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(11–12):1336–48. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0712>.
- Baril DT, Patel VJ, Judelson DR, Goodney PP, McPhee JT, Hevelone ND, et al. Outcomes of lower extremity bypass performed for acute limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2013;58(4):949–56.
- G. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing. Conte MS, Pomposelli FB, Clair DG, Geaghty PJ, McKinsey JF, et al. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg*. 2015;61(3 Suppl):25–415.
- Cleary MA, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y, Breuer C. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med*. 2012;18(7):394–404. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.013>.
- Yamanami M, Kanda K, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Gjojo S, et al. Development of xenogeneic decellularized bio tubes for off-the-shelf applications. *Artif Organs*. 2019;43(8):773–9. <https://doi.org/10.1111/aor.13432>.
- Reinhardt JW, Rosado JR, Barker JC, Lee YU, Best CA, Yi T, et al. Early natural history of neotissue formation in tissue-engineered vascular grafts in a murine model. *Regen Med*. 2019;14(5):389–408. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0133>.

29. Syedain ZH, Graham ML, Dunn TB, O'Brien T, Johnson SL, Schumacher RJ, et al. A completely biological "off-the-shelf" arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Sci Transl Med*. 2017;9(414). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4209>.
30. Ju YM, Ahn H, Arenas-Herrera J, Kim C, Abolbasha M, Atala A, et al. Electrospun vascular graft for cellularized small diameter blood vessels: a preclinical large animal study. *Acta Biomater*. 2017;59:58–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.027>.
31. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howarietz N, Froschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(5 Suppl):S327–31. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)02555-3](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)02555-3).
32. Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, White-Flores S, Samson RH, Scher LA, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg*. 1986;3(1):104–14. [https://doi.org/10.1016/0741-5214\(86\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0741-5214(86)90073-X).
33. Yuan H, Chen C, Liu Y, Lu T, Wu Z. Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(3):426–45. <https://doi.org/10.1002/jbmb.38825>.
34. Ma X, He Z, Li L, Liu G, Li Q, Yang D, et al. Development and in vivo validation of tissue-engineered, small-diameter vascular grafts from decellularized aortae of fetal pigs and canine vascular endothelial cells. *J Cardiothorac Surg*. 2017;12(1):101. <https://doi.org/10.1186/s13019-017-0661-x>.
35. Lau S, Eicke D, Carvalho Oliveira M, Wiegmann B, Schimpf C, Haverich A, et al. Low immunogenic endothelial cells maintain morphological and functional properties required for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(5–6):432–47. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0541>.
36. Zhang Y, Li XS, Guex AG, Liu SS, Muller E, Malini R, et al. A compliant and biomimetic three-layered vascular graft for small blood vessels. *Biofabrication*. 2017;9(2):025010. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa6bae>.
37. Heermann FB, Lamm P, Wellmann P, Mitz S, Hagl C, Juchem G. Autologous endothelialized vein allografts in coronary artery bypass surgery – long term results. *Biomaterials*. 2019;212:87–97. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.019>.
38. Melchioni AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP. In vitro Endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(7):663–70. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0562>.
39. Guo HF, Dai WW, Qian DH, Qin ZX, Lei Y, Hou XY, et al. A simply prepared small-diameter artificial blood vessel that promotes in situ endothelialization. *Acta Biomater*. 2017;54:107–16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.038>.
40. Glynn JJ, Hinds MT. Endothelial outgrowth cells regulate coagulation, platelet accumulation, and respond to tumor necrosis factor similar to carotid endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(1–2):174–82. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0032>.
41. Anliery RF, Hinds MT, Nerem RM. Dynamic shear stress regulation of inflammatory and thrombotic pathways in baboon endothelial outgrowth cells. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(13–14):1573–82. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0300>.
42. Ahmann KA, Johnson SL, Hebbel RP, Tranquillo RT. Shear stress responses of adult blood outgrowth endothelial cells seeded on bioartificial tissue. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19–20):2511–21. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0055>.
43. Achneck HE, Jamiolkowski RM, Jantzen AE, Haseltine JM, Lane WD, Huang JK, et al. The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells: EPC-seeded antithrombotic Ti implants. *Biomaterials*. 2011;32(1):10–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.073>.
44. Bompas H, Chagraoui J, Carron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103(7):2577–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2770>.
45. Gomez-Aristizabal A, Keating A, Davies JE. Mesenchymal stromal cells as supportive cells for hepatocytes. *Mol Ther*. 2009;17(9):1504–8. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.158>.
46. Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2007;25(7):1761–8. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0022>.
47. Pedersen TO, Blois AL, Xue Y, Xing Z, Sun Y, Finne-Wistrand A, et al. Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):23. <https://doi.org/10.1186/scrt112>.
48. Pfeiffer D, Wankhammer K, Stefanitsch C, Hingerl K, Huppertz B, Dohr G, et al. Amnion-derived mesenchymal stem cells improve viability of endothelial cells exposed to shear stress in ePTFE grafts. *Int J Artif Organs*. 2019;42(2):80–7. <https://doi.org/10.1177/0391398818815470>.
49. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143–7. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
50. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402–16. <https://doi.org/10.1016/j.jexphem.2005.07.003>.
51. Kolapanthy LK, Sarivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue – Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J Stem Cells*. 2015;8(2):121–7. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.2.121>.
52. Roter N, Oder J, Schlenker P, Lindner U, Bohrsen F, Kramer J, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev*. 2008;17(3):509–18. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0180>.
53. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissue vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792–806.
54. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>.
55. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>.
56. Inoguchi H, Tanaka T, Maehara Y, Matsuda T. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. *Biomaterials*. 2007;28(3):486–95. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.020>.
57. Kamiya A, Bukhari R, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bull Math Biol*. 1984;46(1):127–37. [https://doi.org/10.1016/S0092-8240\(84\)80038-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8240(84)80038-5).
58. Golligorsky J. Vein grafts: haemodynamic forces on the endothelium—a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997;14(5):333–43. [https://doi.org/10.1016/S1078-5884\(97\)80282-1](https://doi.org/10.1016/S1078-5884(97)80282-1).
59. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottorai VS, Mabon RF, Gogov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983;53(4):502–14. <https://doi.org/10.1161/01.res.53.4.502>.
60. Balemann BJ, Dandik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl*. 1998;67S100–8. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x>.
61. Yazdani SK, Tilman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL. The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg*. 2010;51(1):174–83. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.08.074>.
62. Nelson GN, Roh JD, Mirensky TL, Wang Y, Yi T, Telides G, et al. Initial evaluation of the use of USPIO cell labeling and noninvasive MR monitoring of human tissue-engineered vascular grafts in vivo. *FASEB J*. 2008;22(11):3888–95. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107367>.
63. Harrington JK, Chahboune H, Crisóstone JM, Li AY, Hibino N, Yi T, et al. Determining the fate of seeded cells in venous tissue-engineered vascular grafts using serial MRI. *FASEB J*. 2011;25(12):4150–61. <https://doi.org/10.1096/fj.11-185140>.
64. Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng*. 1999;64(5):580–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4290\(199905\)64:5<580::AID-BIT8>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4290(199905)64:5<580::AID-BIT8>3.0.CO;2-X).
65. Hall JE. In: Saunders WB, editor. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13th ed. 2015.
66. Shaheen MF, Joo DJ, Ross JJ, Anderson BD, Chen HS, Huebert RC, et al. Sustained perfusion of revascularized bioengineered livers heterotopically transplanted into immunosuppressed pigs. *Nat Biomed Eng*. 2020;4(4):437–45. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0460-x>.
67. Ran X, Ye Z, Fu M, Wang Q, Wu H, Lin S, et al. Design, preparation, and performance of a novel bilayer tissue-engineered small-diameter vascular graft. *Macromol Biosci*. 2019;19(3):e1800189. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800189>.

68. Goins A, Ramaswamy V, Lichlyter D, Webb A, Allen JB. Fabrication of a bilayer graft for small diameter vascular applications. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(11):2850–62. <https://doi.org/10.1002/jbma.36473>.
69. Zhang J, Wang Y, Liu C, Feng F, Wang D, Mo H, et al. Polyurethane/polyurethane nanoparticle-modified expanded poly (tetrafluoroethylene) vascular patches promote endothelialization. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(8):2131–40. <https://doi.org/10.1002/jbma.36419>.
70. Asadpour S, Ai J, Davoudi P, Ghorbani M, Jalali Monfared M, Gharbari H. In vitro physical and biological characterization of biodegradable elastic polyurethane containing ferulic acid for small-caliber vascular grafts. *Biomed Mater*. 2018;13(3):035007. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa88b6>.
71. Guo X, Zhu J, Zhang H, You Z, Mosi Y, Mo X, et al. Facile preparation of a controlled-release tubular graft for blood vessel implantation. *J Colloid Interface Sci*. 2019;539:351–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.086>.
72. Lopez-Ruiz E, Venkateswaran S, Peran M, Jimenez G, Pernagallo S, Diaz-Mochon JJ, et al. Poly (ethylmethacrylate-co-diethylaminoethyl acrylate) coating improves endothelial re-population, bio-mechanical and anti-thrombogenic properties of decellularized carotid arteries for blood vessel replacement. *Sci Rep*. 2017;7(1):407. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00294-6>.
73. Kaplan Q, Hielemann T, Krajewski S, Kurz J, Nevorolova M, Houska M, et al. Low-thrombogenic fibrin-heparin coating promotes in vitro endothelialization. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(11):2995–3005. <https://doi.org/10.1002/jbma.36152>.
74. Meiring M, Khemisi M, Laker I, Dohmen PM, Smit FE. Tissue engineered small vessel conduits - the anti-thrombotic effect of re-Endothelialization of Decellularized baboon arteries: a preliminary experimental study. *Med Sci Monit Basic Res*. 2017;23:344–51. <https://doi.org/10.12659/MSMBR905978>.
75. Post A, Kahan AP, Diaz-Rodriguez P, Tuzun E, Hahn M, Cosgriff-Hernandez E. Introduction of sacrificial bonds to hydrogels to increase defect tolerance during suturing of multilayer vascular grafts. *Acta Biomater*. 2018;69:313–22. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.033>.
76. Iserberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng*. 2006;34(6):971–85. <https://doi.org/10.1007/s10439-006-9101-0>.
77. Gygortczyk R, Orlov SN. Effects of hypoxia on erythrocyte membrane properties-implications for intravascular hemolysis and putrefactive control of blood flow. *Front Physiol*. 2017;8:1110. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01110>.
78. Hedeman Joosten PP, Verhagen HJ, Heijnen-Snyder GJ, van Vroonhoven TJ, Sijma JJ, de Groot PG, et al. Thrombogenesis of different cell types seeded on vascular grafts and studied under blood-flow conditions. *J Vasc Surg*. 1998;28(6):1094–103. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(98\)70036-9](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(98)70036-9).
79. McGuigan AP, Sefton MV. The thrombogenicity of human umbilical vein endothelial cell seeded collagen modules. *Biomaterials*. 2008;29(16):2453–63. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.010>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. **E. Keshi**, P. Tang, M. Weinhart, H. Everwien, S. Moosburner, N. Seiffert, M. Lommel, U. Kertzschner, B. Globke, A. Reutzel-Selke, B. Strucker, J. Pratschke, I.M. Sauer, N. Haep, K.H. Hillebrandt, Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity, *J Biol Eng* 15(1) (2021) 26.F. (Impact Factor: 4.355*)
2. Krenzien*, **E. Keshi***, K. Splith, S. Griesel, K. Kamali, I.M. Sauer, L. Feldbrugge, J. Pratschke, A. Leder and M. Schmelzle: "Diagnostic Biomarkers to Diagnose Acute Allograft Rejection After Liver Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy Studies." *Front Immunol.* 2019; 10: 758, * Contributed equally (Impact Factor: 4.716)
3. **E. Keshi**, I.M. Sauer, K.H. Hillebrandt: "Engineering an endocrine Neo-Pancreas" Decellularized Extracellular Matrix: Characterization, Fabrication and Applications. Royal Society of Chemistry. Edited by T. Yamaoka and T. Hoshiba. ISBN: 978-1-83916-126-1.
4. N. Seiffert, P. Tang, **E. Keshi**, A. Reutzel-Selke, S. Moosburner, H. Everwien, D. Wulsten, H. Napierala, J. Pratschke, I.M. Sauer, K.H. Hillebrandt, B. Struecker, In vitro recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells, *J Biol Eng* 15(1) (2021) 15. (Impact Factor: 4.355*)
5. H. Everwien, **E. Keshi**, K.H. Hillebrandt, B. Ludwig, M. Weinhart, P. Tang, A.S. Beierle, H. Napierala, J.M. Gassner, N. Seiffert, S. Moosburner, D. Geisel, A. Reutzel-Selke, B. Strucker, J. Pratschke, N. Haep, I.M. Sauer, Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model, *Acta Biomater* 117 (2020) 213-225. (Impact Factor: 6.319)
6. L. Elomaa, **E. Keshi**, I.M. Sauer, M. Weinhart, Development of GelMA/PCL and dECM/PCL resins for 3D printing of acellular in vitro tissue scaffolds by stereolithography, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 112 (2020) 110958. (Impact Factor: 7.328)
7. K.H. Hillebrandt, H. Everwien, N. Haep, **E. Keshi**, J. Pratschke and I.M. Sauer: "Strategies based on organ decellularization and recellularization." *Transpl Int.* 2019; 32(6): 571-585 (Impact Factor: 3.526)

8. E.M. Dobrindt, **E. Keshi**, Y. Salim, A. Gillespie, A. Saipbaev, W. Schoning, R. Ollinger, J. Pratschke, D. Eurich, Hepatitis B Immunoglobulin discontinuation in long-term liver transplant patients, *Transpl Infect Dis* 22(4) (2020) e13303. (Impact Factor: 2.228)
9. E.M. Dobrindt, **E. Keshi**, J. Neulichedl, W. Schoning, R. Ollinger, J. Pratschke, D. Eurich, Long-term Outcome of Orthotopic Liver Transplantation in Patients With Hemochromatosis: A Summary of a 30-year Transplant Program, *Transplant Direct* 6(6) (2020) e560. (Impact Factor: 1.59)
10. P. Brunnbauer, A. Leder, C. Kamali, K. Kamali, **E. Keshi**, K. Splith, S. Wabitsch, P. Haber, G. Atanasov, L. Feldbrugge, I.M. Sauer, J. Pratschke, M. Schmelzle and F. Krenzien: "The nanomolar sensing of nicotinamide adenine dinucleotide in human plasma using a cycling assay in albumin modified simulated body fluids." *Sci Rep.* 2018; 8(1): 16110. (Impact Factor: 4.011)
11. D. Kirac, F. Eraydin, T. Avcilar, K. Ulucan, F. Özdemir, A.I. Guney, E.C. Kaspar, **E. Keshi**, T. Isbir. Effects of PAX9 and MSX1 gene variants to hypodontia, tooth size and the type of congenitally missing teeth. *Cell Mol Biol* 2016; 62(13): 78-84 (Impact Factor: 1.463)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Mentoren Prof. Dr. med. Igor Sauer und Dr. med. Karl Herbert Hillebrandt und aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin für ihre stetige Unterstützung im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Des Weiteren, danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Experimentelle Chirurgie insbesondere Frau Dr. Anja Reutzel-Selke und Herrn Peter Tang, sowie allen Kooperationspartner*innen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Abschließend danke ich meinem Lebensgefährten, Herrn Dukagjin Sallteku, für seine bedingungslose Hilfe und Unterstützung.